

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Construction du mutant d'un régulateur transcriptionnel impliqué dans un système de communication bactérien chez *Brucella melitensis* 16M

Delory, Marie

Award date:
2000

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

**Construction du mutant d'un régulateur transcriptionnel
impliqué dans un système de communication bactérien
chez *Brucella melitensis* 16M**

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques

Marie DELORY

Juin 2000

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Construction du mutant d'un régulateur transcriptionnel impliqué dans un système de communication bactérien chez *Brucella melitensis* 16M

DELORY Marie

Résumé

Le quorum sensing est un système de communication bactérien, dépendant de la densité cellulaire, basé sur l'accumulation d'une phéromone diffusible appelée homosérine lactone. Les bactéries utilisent ce type de communication pour réguler divers comportements de groupe, comme l'émission de lumière, la conjugaison et la production de facteurs de virulence. La récente découverte d'un régulateur transcriptionnel (BabR) chez *Brucella abortus* et *B. melitensis* pose la question des rôles possibles du quorum sensing chez ces espèces. En effet, *Brucella* est une bactérie pathogène à tropisme intracellulaire dont la virulence est encore mal connue. Le but de ce travail est la création d'un mutant de *babR*, chez *B. melitensis* 16M, par deux méthodes parallèles : la délétion par une cassette de résistance à un antibiotique et la disruption intégrative par un plasmide portant un fragment interne du gène.

Deux candidats intégrants ont été isolés. Leur génotype a été vérifié par PCR et analysé en southern blotting avec une sonde interne à *babR*. Cette analyse montre que les deux intégrants ont disrupté le gène *babR*. Afin d'obtenir une première indication de l'importance relative de *babR* pour la virulence de *Brucella*, leur survie intracellulaire a été comparée à celle de la souche sauvage dans une infection *ex vivo* de cellules HeLa. Suite à cette expérience préliminaire, un seul mutant *babR* montre une survie intracellulaire significativement moindre par rapport au sauvage. Ce mutant intégratif ainsi que le délétant en cours de construction ouvre la porte au décryptage des cascades de régulation dépendantes du quorum sensing chez *Brucella*.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2000

Promoteur: J.-J. Letesson

Je tiens tout d'abord à remercier le professeur Jean-Jacques Letesson de m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Merci à Bernard pour m'avoir suivi avec **beaucoup** de patience et de gentillesse au cours de ces derniers mois, de m'avoir soutenue et encouragée dans les moments plus difficiles, d'avoir été présent à chaque instant.

Merci aussi à tous les membres du laboratoire de microbiologie pour leur encouragement, leurs conseils, leur joie de vivre qui ont fait de ce mémoire une expérience inoubliable. Merci à Katalin, Calou (un point en plus), Christian, David, Xavier, Poos, Garçon, Zette, Valery, Etienne... Merci aussi à Anne qui n'a pas hésité à me consacrer parfois une partie de son temps et pour ses conseils avisés.

Merci aussi à mes parents, à mes grands parents et à mes amis pour leur soutien au combien précieux, pour m'avoir supporté et encouragé tout au long de ces années d'études et pour avoir toujours cru en moi .

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	3
1. Généralités.....	3
1.1. Le comportement multicellulaire.....	3
Les biofilms bactériens.....	4
La "swarming motility".....	5
Les corps fructifères.....	5
2. La communication bactérienne.....	6
2.1. Exemples de différents modes de communication bactériens.....	7
Les peptides chez les bactéries Gram-positives.....	7
Les butyrolactones chez <i>Streptomyces griseus</i>	8
<i>Myxococcus xanthus</i>	8
3. Le quorum sensing.....	10
3.1. Historique.....	10
3.2. <i>Photobacterium fisheri</i> et la luminescence.....	11
La bactérie.....	11
Les acteurs du quorum sensing.....	11
Le fonctionnement du système.....	12
3.3. Les autres phénomènes dépendants de la densité cellulaire.....	13
L'auto induction chez <i>Erwinia carotovora</i>	13
Le transfert conjugatif chez <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	14
Les facteurs de virulence extracellulaires de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
3.4. Les acteurs du quorum sensing.....	18
Les N-acylhomosérine lactones.....	18
LuxI et ses homologues.....	20
LuxR et ses homologues.....	21
L'organisation génétique.....	22
3.5. Les fonctions régulées par le quorum sensing.....	23
3.6. Les Quorum sensing blocker (QSB's).....	24
4. <i>Brucella</i> sp. bactérie pathogène.....	25
BUT DU MÉMOIRE.....	27
RESULTATS ET DISCUSSION.....	28
1. Construction d'un délétant.....	28
1.1. Construction du plasmide pBluescript SKoriT <i>babR</i>	28
1.2. Amplification par PCR du pSK oriT et d'une partie du régulateur.....	29
1.3. Amplification par PCR de la cassette <i>kan</i>	30
1.4. Clonage de <i>kan</i> dans pSK oriT <i>babR</i> *.....	30
1.5. Conjugaison : <i>E. coli</i> S17 → <i>B. melitensis</i> 16M.....	31
1.6. Discussion.....	31
2. Construction d'un disruptant intégratif.....	32
2.1. Amplification par PCR de la partie interne de <i>babR</i>	32
2.2. Clonage de <i>babintern</i> dans le pSK oriT <i>kan</i>	33
2.3. Conjugaison : <i>E. coli</i> S17 → <i>B. melitensis</i> 16M.....	34
2.4. Vérification du génotype des 2 candidats obtenus par PCR et Southern blot.....	35
A. PCR.....	35

B. Southern blot.....	36
2.5. Infection de cellules HeLa.....	37
2.6. Discussion.....	37
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	39
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	42
1. Souches bactériennes et plasmides.....	42
1.1 Souches bactériennes.....	42
1.1.1 E. coli XL1-blue.....	42
1.1.2 E. coli DH5 α	42
1.1.3 E. coli S17- λ pir.....	43
1.1.4 Brucella sp.....	43
1.2 Plasmides bactériens (figure 2).....	43
1.2.1. pBluescript.....	43
1.2.2. pBluescript SK-oriT.....	43
1.2.3. pUC4K.....	43
2. Milieux de culture.....	44
Milieu Luria Bertani (LB).....	44
Milieu LB solide.....	44
Milieu 2YT.....	44
Milieu RPMI 1640.....	44
3. Conjugaison (figure 3).....	44
4. Techniques d'ADN recombinant.....	45
4.1. Minipréparation d'ADN plasmidique d' <i>E. coli</i>	45
4.2. Restriction de l'ADN.....	46
4.3. Electrophorèse en gel d'agarose.....	46
4.4 Extraction d'ADN d'un gel d'agarose.....	47
4.5. Réaction de déphosphorylation.....	47
4.6. Réaction de ligation.....	48
5. Transformation bactérienne.....	48
6. Electroporation bactérienne.....	50
7. Amplification d'ADN par PCR.....	51
7.3. Purification de produits PCR.....	51
8. Séquençage de l'ADN.....	52
9. Analyse de l'ADN génomique de <i>Brucella sp.</i> par Southern blot.....	53
9.1. Extraction de l'ADN génomique de <i>Brucella sp.</i>	53
9.2. Southern blot.....	53
9.2.1. Marquage de la sonde et vérification.....	54
9.2.2. Electrophorèse en gel d'agarose.....	54
9.2.3. Transfert et immobilisation.....	54
9.2.4. Hybridation.....	54
9.2.5. Détection et révélation.....	55
10. Etude de la virulence : modèle cellulaire.....	55
10.1. Croissance et infection de cellules HeLa en plaques multipuits.....	55
10.3. Quantification de la DI.....	56
10.4. Dénombrement des bactéries intracellulaires.....	56
BIBLIOGRAPHIE.....	57

INTRODUCTION

1. Généralités.

1.1. Le comportement multicellulaire.

L'image selon laquelle, au sein d'une colonie ou d'une culture, chaque bactérie est un organisme indépendant et isolé a émergé suite aux travaux de microbiologistes comme Koch. Cette pensée a influencé les scientifiques pendant plus d'un siècle. Ceux-ci se sont rendu compte finalement qu'une cellule bactérienne est capable de percevoir les autres bactéries et de leur répondre. Ce genre de comportement est important pour la survie de la bactérie en milieu naturel, non seulement comme moyen de défense contre les prédateurs et les organismes avec lesquels elle entre en compétition, mais aussi pour obtenir des informations des cellules environnantes. Ces informations fournissent à la bactérie un moyen de s'adapter dynamiquement aux conditions environnementales. Elle peut percevoir les informations concernant l'énergie, les nutriments et la disponibilité en O₂, mais également le niveau de maturité et de densité de la population locale pour synchroniser les processus de croissance et de développement de la communauté (Miller *et al.*, 1989; Ulitzur, 1989)

Les bactéries ont développé des mécanismes de régulation qui les rendent capables de sentir et de répondre aux changements environnementaux. Elles peuvent aussi, grâce à ces systèmes, communiquer avec les organismes supérieurs (végétaux et animaux), par exemple les bactéries du genre *Rhizobium* qui vivent en symbiose avec les légumineuses ou *Agrobacterium tumefaciens* qui est responsable de l'apparition de tumeurs chez un grand nombre de plantes,... (Pierson III *et al.*, 1998).

Bien que les bactéries soient des êtres unicellulaires, ce sont aussi des créatures sociales capables d'adopter des comportements multicellulaires. Dans certains cas, ces associations impliquent la différenciation ou la spécialisation de cellules individuelles à l'intérieur de la population, par exemple la formation des hétérocystes chez les cyanobactéries filamenteuses (Kaiser and Losick, 1993) (figure.1). Les cyanobactéries possèdent la capacité de fixer l'azote atmosphérique, ce qui leur fournit une source azotée pour la formation d'acides aminés comme le glutamate. Cependant elles génèrent au cours de la photosynthèse un sous produit,

l'oxygène, hautement toxique pour la nitrogénase. Elles ont donc développé des systèmes de protection pour empêcher l'inactivation de leur nitrogénase par l'O₂. Un de ces systèmes est la formation d'hétérocystes. Ce sont des cellules hautement différenciées dont le seul but est de fournir un environnement anaérobie pour le fonctionnement de la nitrogénase. Elles acquièrent pour cela des enveloppes supplémentaires qui réduisent la diffusion des gaz. Ce processus est associé à une perte de l'activité du photosystème II. Une fois que le dinitrogène est converti en glutamate, il est exporté vers les cellules végétatives (Adams, 1997). Certaines cellules se différencient donc pour assurer le bien être de l'ensemble de la population.

Cependant, l'organisation multicellulaire et le comportement coordonné peuvent aussi se retrouver dans des populations homogènes de bactéries ne manifestant aucune division du travail. La population est à présent considérée dans son entièreté. C'est elle qui altère sa morphologie, sa physiologie et son comportement en réponse à des changements environnementaux. Un véritable comportement de groupe se manifeste ici (Allison *et al.*, 1992).

Parmi ces phénomènes multicellulaires, les plus spectaculaires sont les biofilms, le swarming motility et la formation des corps fructifères.

Les biofilms bactériens

Ce sont des communautés complexes, hautement différenciées, constituées dans la nature de plusieurs espèces de bactéries et se développant à l'interface d'un milieu solide et liquide. La formation d'un biofilm bactérien se passe en plusieurs étapes. Tout d'abord, les bactéries cherchent un endroit où elles pourront s'établir. Elles tentent d'adhérer à la surface et s'associent ensuite provisoirement avec cette surface et/ou les autres microbes déjà présents. Une fois qu'elles sont établies, elles se rassemblent pour former une microcolonie. Finalement, la colonie se développe en une structure tridimensionnelle. Il existe deux types de bactéries observables dans le biofilm, les fixes (cellules différenciées) qui constituent des sortes de piliers entre lesquels circulent les nutriments et les circulantes (cellules planctoniques) qui nagent entre ces piliers. Si les conditions environnementales deviennent défavorables, les bactéries fixées peuvent se détacher du biofilm (Watnick and Kolter, 2000) (figure 2).

Comme la bactérie change d'environnement, elle va devoir s'adapter aux nouvelles conditions existantes, ce qui implique une modification des gènes exprimés. C'est le cas par exemple pour *Escherichia coli* chez qui la synthèse de la flagelline diminue lorsqu'il est associé à un biofilm, afin d'éviter toute déstabilisation du biofilm, tandis que la production d'acide colanique, un exo-polysaccharide, augmente pour renforcer la structure du biofilm (Prigent-

Combaret *et al.*, 1999). Un des avantages de ce mode de vie, c'est la capacité d'acquérir à des taux accélérés des éléments génétiques transmissibles. En effet, plusieurs travaux montrent l'augmentation du taux de conjugaison et de compétence chez les populations bactériennes appartenant à un biofilm. Le biofilm peut donc être perçu comme un lieu privilégié pour l'émergence de nouveaux pathogènes par acquisition de marqueurs de résistance aux antibiotiques, de facteurs de virulence...(Watnick and Kolter, 2000).

La "swarming motility".

Proteus mirabilis est une bactérie pathogène Gram-négative, considérée comme l'une des principales causes des infections urinaires dans les hôpitaux. Lorsqu'elle croît dans un milieu liquide approprié, elle se présente sous la forme d'une cellule mobile qui fait 1,5 à 2 µm de long et qui possède 6 à 10 flagelles péritriches. Ces bactéries, appelées cellules nageuses, manifestent des comportements de nage et chémotactiques caractéristiques (Adler, 1983). Un changement important a lieu dans la morphologie des cellules lorsqu'elles sont transférées d'un milieu liquide vers un milieu solide, les cellules commencent à s'allonger. Ce changement est le premier pas vers la production d'une cellule morphologiquement et biochimiquement différente, "la swarmer cell" ou cellule essaim qui peut atteindre 60 à 80 µm de long et possède 10^3 à 10^6 flagelles par cellule. Ce processus d'élongation est dû à l'inhibition du mécanisme de septation normal entraînant l'apparition d'une cellule polyploïde. (Belas *et al.*, 1995). La septation et la division peuvent éventuellement reprendre aux extrémités de ces longues cellules et produire ainsi des microcolonies de cellules différenciées. Contrairement aux cellules nageuses, les "swarmer cells" ont la capacité de se déplacer sur des milieux solides grâce à un processus de translocation qui ressemble à un essaimage. Cette mobilité particulière est un avantage significatif pour la colonisation rapide de divers environnements. Cependant, chaque cellule prise individuellement n'en a pas la capacité. Le swarming est le résultat d'un effort de groupe coordonné (Belas, 1997) (figure 3).

Les corps fructifères.

Les myxobactéries sont des bâtonnets mobiles Gram-négatifs qui colonisent les sols. Elles exhibent des comportements sociaux complexes qui leur permettent d'optimiser la qualité de leur alimentation. Ces bactéries vivent en petits groupes d'individus tant que les ressources alimentaires sont suffisantes. Lorsque celles-ci se raréfient, des milliers de cellules de la même espèce s'agglutinent pour former des structures multicellulaires nommées corps fructifères. Les cellules en forme de batonnets qui font partie de ces corps fructifères naissants se différencient ensuite en myxospores sphériques, résistants à la chaleur et à la dessiccation.

La formation de ces corps fructifères permet à des milliers de spores d'être entraînées vers des lieux plus cléments où elles pourront établir de nouvelles colonies (Shimkets and Kaiser, 1999) (figure 4).

Pour orchestrer ce genre de comportement multicellulaire, les bactéries ont mis au point divers systèmes de communication.

2. La communication bactérienne.

Au début des années 90, l'étude des systèmes de communications bactériens se résumait à travailler sur un système considéré au départ comme étant propre à une espèce bactérienne. Depuis lors, ces différents systèmes ont été découverts chez d'autres espèces bactériennes, comme *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas aeruginosa*... De plus, de nouvelles molécules signaux sont régulièrement identifiées. Ces données ont permis aux scientifiques de se rendre compte que la communication bactérienne est la règle et non plus l'exception.

Les systèmes de communication développés par les bactéries les rendent capables de sentir leur densité de population et de réguler en conséquence l'expression de leurs gènes. Malgré la diversité des systèmes existants, il est possible d'en retirer certaines règles générales concernant la régulation des gènes. Un système de communication bactérien se compose en général d'un émetteur, d'un signal et d'un récepteur capable de comprendre ce signal et d'y répondre. Afin que l'ensemble de la population soit touchée par le signal, celui-ci doit être capable de diffuser dans le milieu extérieur. De plus, étant donné qu'une population bactérienne est constituée d'un grand nombre d'individus, il est important que le message véhiculé parvienne rapidement à tous les membres du groupe. Pour cela, certaines bactéries ont mis au point un mécanisme d'amplification du signal, celui-ci est plus communément appelé auto-induction (le signal stimule sa propre synthèse chez les autres bactéries).

Le quorum sensing, ou contrôle de l'expression des gènes en réponse à la densité cellulaire, est un des mécanismes de régulation les plus répandus. Il est utilisé à la fois par les bactéries Gram-négatives et Gram-positives pour réguler un grand nombre de fonctions physiologiques. Cette communication intercellulaire joue un rôle majeur en permettant aux bactéries d'organiser leurs structures communautaires complexes (Bassler, 1999). La plupart des fonctions régulées par ce système de communication sont des traits adaptatifs ou

avantageux mais uniquement lorsqu'une quantité suffisante de bactéries est présente, par exemple la luminescence, la conjugaison, la production d'antibiotiques et la virulence (Gray, 1997).

Il existe des ressemblances mais également des différences entre les systèmes de quorum sensing utilisés par les bactéries Gram-négatives et Gram-positives.

Chez les bactéries Gram-négatives, le système de quorum sensing est basé sur la production d'acyl-homosérine lactones (HSL). Ces molécules diffusent librement à travers la membrane bactérienne. Une fois qu'elles ont atteint une concentration critique, elles se lient à une protéine régulatrice et l'active, permettant d'induire ou de réprimer la transcription des gènes cibles. Ce système sera détaillé plus en détails au point 3 de l'introduction.

2.1. Exemples de différents modes de communication bactériens.

Avant d'entamer le chapitre sur le quorum sensing, un bref descriptif des autres systèmes de communication existants chez les bactéries est proposé.

Le Tableau I reprend une liste non exhaustive de divers systèmes de communication découvert dans le monde bactérien.

Dans le cas des bactéries Gram-positives, la molécule signal est un peptide. Des transporteurs ABC (ATP-binding cassette) spécialisés maturent ces peptides et les exportent. Ils sont ensuite reconnus par des protéines kinases membranaires qui jouent le rôle de senseurs. Il y a finalement transduction du signal (par phosphorylation) du senseur vers un régulateur cytoplasmique qui va influencer la transcription de gènes cibles spécifiques. (fig.5).

Pour certains exemples, le lecteur intéressé pourra trouver des détails des mécanismes moléculaires en encadré. Toutefois, la lecture de ceux-ci n'est pas indispensable à la compréhension du manuscrit.

Les peptides chez les bactéries Gram-positives.

La transformation (ou capacité à incorporer de l'ADN présent dans le milieu) est le seul mécanisme d'échange de matériel génétique encodé chromosomiquement. Chez *Bacillus subtilis*, la transformation nécessite l'acquisition d'un état de compétence lié à un facteur phéromonal libéré dans le milieu. Ce facteur est un *peptide* linéaire constitué de 9 à 10 acides aminés.

Ce peptide est issu d'un « pré-peptide » encodé par le gène *comX*. La phéromone peptidique, une fois excrétée, est perçue par une perméase, SpoOK, localisée dans la membrane et possédant une activité ATPase. Il en résulte (via un mécanisme inconnu) la phosphorylation de ComP qui transfère ensuite son phosphate sur ComA. Ces deux protéines font partie d'un système de transduction du signal à deux composantes où ComP jouerait le rôle de senseur et ComA, le rôle de régulateur. ComA-phosphate active directement un opéron de 25 Kb, *srfA*, encodant les synthétases intervenant dans la synthèse de la surfactine, un antibiotique lipopeptidique et le gène encodant la protéine ComS, qui permettrait d'activer indirectement la transcription du gène *comK*. ComK est un facteur de transcription sujet à une autorégulation, et activant l'expression des gènes de compétence (*comC*, *comE*, *comF* et *comG*). (Wirth *et al.*, 1996) (fig.6).

Un second peptide signal, CSF (facteur de compétence et de sporulation), est importé dans la cellule aussi grâce à un transporteur ABC. Une faible concentration interne en CSF permet le développement de la compétence, tandis qu'une concentration plus importante inhibe la compétence et entraîne la sporulation (Bassler, 1999; Kleerebezem *et al.*, 1997).

Les butyrolactones chez *Streptomyces griseus*.

S. griseus utilise quant à lui des signaux de type γ -butyrolactones. Un de ces signaux, le facteur A, déclenche la production de streptomycine, la résistance à la streptomycine, la production d'un pigment jaune et la formation d'hyphes aériens (préludes à la sporulation). Cette molécule semble être produite à un taux basal pendant la croissance végétative et lorsqu'elle atteint une concentration de l'ordre du nanomolaire, elle est capable d'induire la différenciation en interagissant avec un récepteur protéique intracellulaire appelé ArpA. En l'absence du facteur A, ArpA fonctionne comme un répresseur et empêche l'expression de gènes intervenant dans la production d'antibiotiques et dans la différenciation. *Streptomyces coelicolor* sécrète un facteur similaire (Wirth *et al.*, 1996).

Il existe chez les bactéries Gram-négatives des phéromones autres que les HSL.

Myxococcus xanthus.

Ces bactéries Gram-négatives utilisent des mécanismes de signalisation ressemblant à ceux des bactéries Gram-positives. Elles ont la capacité de former des complexes visibles à l'œil nu, appelés corps fructifères, lorsque la colonie se retrouve en carence nutritionnelle. Les trois conditions requises pour ce comportement multicellulaire sont non seulement la carence nutritionnelle, mais également un milieu solide et une haute densité cellulaire (Plamann and

Kaplan, 1999). La formation des corps fructifères est régulée par un système de communication unique à ce jour.

Le *facteur A* et le *facteur C* sont deux des messagers chimiques les mieux connus qui commandent la formation des corps fructifères chez cette bactérie.

Le *facteur A* est un signal de densité cellulaire, composé d'une soupe de peptides et d'acides aminés. L'ensemble de ce facteur A est généré par l'activité catalytique, sur des substrats extracellulaires, de deux protéases excrétées dans l'environnement extérieur. Trois locus sont apparemment impliqués dans la production de ce facteur, le locus *asgA*, *asgB* et *asgC* (Kuspa and Kaiser, 1989). La figure 7 représente un des nombreux modèles illustrant le rôle des produits des gènes *asg*. *AsgA* interagit avec un senseur de nature inconnue. Cette interaction entraîne l'activation de la protéine *AsgA* par autophosphorylation. Ce phosphate est ensuite transféré vers une protéine inconnue ou transite par une série de protéines pour aboutir finalement à *AsgB* (un facteur de transcription potentiel). Dans ce modèle, *AsgB* agit comme un répresseur des gènes de développement précoces quand il est non phosphorylé et/ou comme un activateur lorsqu'il est phosphorylé. Les gènes nécessaires à la génération du facteur A, requièrent pour leur expression, la présence du facteur sigma encodé par *AsgC*. L'expression de ces gènes, qui peuvent inclure des gènes encodant des protéases ou un mécanisme de sécrétion, entraîne la libération de protéases extracellulaires qui généreront le facteur A. Finalement, la perception du facteur A et la transduction du signal via un système à deux composantes (*SasS*, le senseur et *SasR*, le régulateur) mène à l'expression de gènes dépendants de ce facteur. Ce signal ne commandera l'agrégation des corps fructifères que lorsqu'un seuil de concentration sera atteint (Plamann and Kaplan, 1999).

Les myxobactéries sont des bâtonnets se mouvant suivant leur grand axe (Leur flagelle étant situé à un pôle du bâtonnet). Afin de former le corps fructifère, les bactéries doivent donc s'aligner en rangées parallèles afin d'optimiser leur mouvement. Une fois que deux myxobactéries sont alignées (pôle à pôle), une protéine *CsgA*, appelée aussi *facteur C*, permet de maintenir cet alignement et de réguler leur mouvement directionnel. Les gènes exprimés suite à cette signalisation sont régulés par une boucle de rétroaction positive qui augmente graduellement la concentration en *CsgA* au cours du développement. Cette augmentation graduelle induit d'abord le glissement par ondulations, puis la formation des corps fructifères et enfin la sporulation. Des incertitudes subsistent encore concernant le moyen de transmission de ce signal d'une cellule à l'autre et des expériences de mutagenèse transpositionnelles suggèrent que la voie de transduction du signal soit constituée de deux parties, une menant aux réponses de mouvement et une autre à la sporulation et au contrôle de l'expression des gènes de fructification (Plamann and Kaplan, 1999) (fig. 8).

Le *facteur E* qui fait également partie de ce système de signalisation est constitué de chaînes branchées d'acides gras. Son implication dans ce système et sa fonction restent encore hypothétiques (Wirth *et al.*, 1996). De même, beaucoup de questions concernant ce système restent encore en suspend.

Parmi les différents mécanismes existants, un semble partagé par un grand nombre de bactéries Gram-négatives . Il est basé sur l'émission de N-acyl-L-homosérine lactones (HSL) et il a été découvert pour la première fois au début des années 70 chez la bactérie luminescente *Photobacterium fisheri* (aussi connue sous le nom de *Vibrio fisheri*) où il permet l'auto induction de la bioluminescence (Dunny and Winans, 1999). Ce système d'auto induction est maintenant connu sous le terme de quorum sensing.

3. Le quorum sensing.

Le quorum sensing décrit un phénomène où l'accumulation d'un signal de faible poids moléculaire permet à chaque cellule bactérienne de ressentir quand la population a atteint la densité minimale requise pour amorcer une réponse concertée de l'ensemble de la population bactérienne (Fuqua *et al.*, 1994).

3.1. Historique.

Le quorum sensing a donc été découvert au début des années 70 chez la bactérie luminescente *P. fisheri* ainsi que chez d'autres bactéries marines apparentées comme *P. Harveyi*. Ces bactéries produisent des composés diffusibles, appelés auto inducteurs, qui s'accumulent dans le milieu pendant la croissance. L'auto induction permet à *P. fisheri* de ressentir sa densité de population et d'exprimer, s'il y a lieu d'être, son système de luminescence. Ce concept selon lequel la bactérie produit des phéromones et communique avec les autres bactéries, a d'abord été accueilli avec beaucoup de scepticisme par les uns et avec désintérêt par les autres. Pourtant, les animaux et les plantes utilisent un grand nombre de molécules signaux notamment comme régulateurs du développement, de la différenciation cellulaire et du métabolisme. Etant donné que ce genre de signaux est largement répandu chez les organismes eucaryotes, il ne serait pas étonnant que les procaryotes emploient également ce genre de molécules (Fuqua and Greenberg, 1998).

Ce système a été considéré pendant longtemps comme étant unique et propre à ces bactéries marines luminescentes. Pourtant, la première allusion au fait que ce système d'auto induction pouvait se retrouver chez d'autres espèces bactériennes survint en 1979. Il fut reporté que des cultures fluides de plusieurs espèces bactériennes marines non luminescentes contenaient une substance qui imitait l'activité de l'auto inducteur de *P. harveyi*. Cependant à cette époque, les structures des molécules signals n'avaient pas encore été déterminées et les gènes de luminescence n'avaient pas encore été identifiés (Fuqua *et al.*, 1994).

Les années 1980 apportèrent plusieurs découvertes scientifiques importantes au sujet de l'auto induction chez *P. fisheri*. Premièrement, la structure de l'autoinducteur fut résolue, deuxièmement, les gènes de luminescence furent identifiés, et troisièmement, la région régulatrice qui commande l'auto induction de la luminescence fut découverte et analysée (Dunlap, 1997).

3.2. *Photobacterium fisheri* et la luminescence.

La bactérie.

P. fisheri est un symbiote spécifique des organes lumineux du calmar *Euprymna scolopes* et de certains poissons marins, il se retrouve également libre dans l'océan. Ces bactéries n'émettent de la lumière que lorsqu'elles sont à haute densité cellulaire ou dans un espace restreint (Gray and Greenberg, 1992; Meighen, 1991).

Le calmar bénéficie de la présence des bactéries luminescentes qui lui permettent d'échapper aux prédateurs qui nagent sous lui. L'association profite également aux bactéries qui trouvent dans l'organe lumineux du calmar nourriture et protection (Visick and Ruby, 1999).

La compréhension du mécanisme d'auto-induction de la bioluminescence chez *P. fisheri* s'est améliorée suite à l'identification de l'auto inducteur (Eberhard, 1972; Nealson *et al.*, 1972) et des gènes de régulation (Engebrecht *et al.*, 1983).

Les acteurs du quorum sensing

L'auto inducteur est la oxo-C6-HSL. Les phéromones de type acyl-HSL sont constituées d'une chaîne acyl de 4 à 14 carbones reliée à un anneau lactone. Les chaînes acyles

peuvent être de différentes longueurs, état d'oxydation et degré de (Fuqua and Eberhard, 1999) (figure 9a)

Les gènes de luminescence (*lux*) de *P. fischeri* sont organisés en deux unités transcriptionnelles divergentes, *luxR* et *luxICDABEG* (l'opéron *lux*), séparées par une région régulatrice contenant les promoteurs de *luxR* et de l'opéron *lux*. *luxA* et *luxB* codent pour les sous-unités α et β de la luciférase. *luxC*, *luxD*, et *luxE* encodent les polypeptides du complexe de réduction des acides gras. Ce complexe est impliqué dans la synthèse et le recyclage des substrats aldéhydes qui serviront à la luciférase (Boylan *et al.*, 1985; Boylan *et al.*, 1989). Le dernier gène de l'opéron *lux*, *luxG*, encode une protéine de fonction inconnue qui n'est pas nécessaire à la luminescence ou à sa régulation chez *E. coli*; *luxG* est suivi d'un terminateur transcriptionnel fort (Swartzman *et al.*, 1990) (figure 9b)

Le premier gène de l'opéron *lux* : *luxI* et *luxR* sont les principaux acteurs du quorum sensing. LuxI est une protéine responsable de la synthèse de l'auto inducteur et LuxR est un activateur transcriptionnel qui une fois fixé à l'auto inducteur permet la transcription de l'opéron *lux* (Engebrecht *et al.*, 1983).

Le fonctionnement du système.

A faible densité cellulaire, *luxI* est transcrit à un niveau basal et permet la synthèse de *N*-3-oxohexanoyl-L-HSL (oxo-C6-HSL). Ces phéromones diffusent librement et s'accumulent dans le milieu de croissance (jusqu'à ce que la concentration intracellulaire soit équivalente à la concentration extracellulaire), elles finissent par atteindre un seuil critique de concentration (5-10 nM pour 10^{10} à 10^{11} cellules/ml) (Kaplan and Greenberg, 1985). Ces molécules se lient et activent alors les protéines LuxR qui vont elles mêmes induire la transcription de l'opéron *lux* (Choi and Greenberg, 1991; Ulitzur, 1989). Il en résulte l'induction de la luminescence et l'expression de *luxI* (premier gène de l'opéron). Cette augmentation de l'expression de *luxI* consiste en un feed back positif, à l'origine de l'appellation autoinduction. Dans l'océan, où *P. fischeri* existe à moins de 10^2 cellules par ml, l'auto induction de la luminescence n'a pas lieu. Comme l'auto inducteur diffuse, il ne peut atteindre une concentration suffisante pour activer les gènes *lux* (Fuqua *et al.*, 1994). (figure 10)

D'autres éléments de régulation peuvent influencer l'expression des gènes de luminescence. L'activation du régulateur transcriptionnel LuxR exige la présence de l'AMPc et de sa protéine réceptrice (Dunlap and Greenberg, 1988). Le fer et l'oxygène peuvent également influencer l'expression de l'opéron (Shadel *et al.*, 1990)...

Un degré de complexité supplémentaire a émergé récemment avec la découverte par Kuo *et al.* d'un deuxième système d'auto induction dépendant du locus *ain* (Kuo *et al.*, 1994). Ce locus encode une protéine AinS, qui ne présente aucune similarité de séquence avec la protéine LuxI et qui permet la synthèse d'une nouvelle phéromone connue sous le nom de *N*-octanoyl-L-HSL (C8-HSL). En interagissant avec la protéine LuxR, celle-ci peut affecter le taux de transcription de l'opéron *lux*. Ce nouveau système, également dépendant de la densité cellulaire, régule non seulement l'expression des gènes *lux* mais probablement aussi l'expression d'autres gènes. Une protéine kinase, appelée AinR, a aussi été identifiée. Elle pourrait être le senseur qui répond à l'autoinducteur produit par AinS (Gilson *et al.*, 1995). La présence de plusieurs systèmes d'auto induction chimiquement et génétiquement distincts mais pouvant interagir entre eux, montre le niveau de complexité que peut atteindre un tel système chez une seule bactérie.

3.3. Les autres phénomènes dépendants de la densité cellulaire.

En 1992, il a été montré que la molécule oxo-C6-HSL était responsable de la régulation de la synthèse de l'antibiotique β -lactame chez la bactérie *Erwinia carotovora*. Ceci montre bien que, contrairement à ce qu'il avait été dit au départ, l'auto induction médiée par les *N*-acyl-L-homosérine lactones n'est pas uniquement connectée à la bioluminescence chez *P. fischeri*. Depuis lors, ce système a été découvert chez un grand nombre de bactéries Gram-négatives comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Agrobacterium tumefaciens*...(table 2)

L'auto induction chez *Erwinia carotovora*.

E. carotovora est une bactérie terrestre pathogène de plantes qui produit un grand nombre d'enzymes capables de dégrader la paroi des cellules végétales. La production de ces exoenzymes est régulée en fin de phase exponentielle de croissance (Pirhonen *et al.*, 1993). *E. carotovora* est également capable de produire des carbapènes, des antibiotiques de type β -lactames, possédant des propriétés antibactériennes et inhibant la β -lactamase. La production d'exoenzymes et de carbapènes est régulée par le quorum sensing (Dunlap, 1997).

Des études sur la production d'exoenzymes chez *E. carotovora* ont permis d'identifier le gène *expI* (exoenzymes production inducer). Ce gène est nécessaire à l'activation de la

transcription des gènes encodant des polygalacturonases, des pectate lyases, des cellulases et des protéases et pour la virulence (Pirhonen *et al.*, 1993).

Pour savoir si ce gène intervenait dans un système de signalisation, une analyse de séquence a été réalisée et a révélé que *expI* encodait une protéine présentant une similarité de séquence avec la protéine LuxI. Ces protéines pourraient donc avoir une fonction analogue (Pirhonen *et al.*, 1993). Des tests de complémentation génétiques ont démontré la similarité fonctionnelle de ces deux protéines. Un allèle sauvage *expI* peut compléter le phénotype non luminescent de mutants *luxI*. De la même façon, un allèle *luxI*⁺ peut compléter le phénotype non producteur d'exoenzymes de mutants *expI*. L'apport d'oxo-C6-HSL complète la production d'exoenzymes chez des mutants *expI* et restaure le phénotype virulent. Ces résultats suggèrent qu'une molécule identique ou fonctionnellement similaire à l'homosérine lactone de *P. fisheri* est impliquée dans le contrôle de l'expression des gènes codant pour les exoenzymes et dans la virulence (Pirhonen *et al.*, 1993).

Un aperçu initial du contrôle de la production de carbapènes par un autoinducteur a été obtenu grâce à des études de complémentations en trans permettant de classer des mutants incapables de produire des carbapènes en deux groupes. Le premier groupe sécrète un composé diffusible de faible poids moléculaire capable de restaurer la production de carbapènes chez le deuxième groupe. Ce composé a été purifié et identifié, c'est la oxo-C6-HSL (Bainton *et al.*, 1992). La synthétase, ExpI, a également été identifiée par un autre groupe de chercheurs sous le nom de *carI*. Un second gène, *carR*, encodant une protéine ayant une homologie de séquence avec LuxR, a été isolée chez *E. carotovora*. CarR fonctionne en trans pour activer la production de carbapènes et jouerait un rôle dans la régulation des exoenzymes (McGowan *et al.*, 1995). Il existe également un gène *expR* adjacent à *expI* et homologue de LuxR. Si ce gène est muté, aucun effet n'est observé sur la production d'exoenzymes et la macération des tissus végétaux. S'il est surexprimé, une réduction de la production des exoenzymes est observée (McGowan *et al.*, 1995). ExpR semble réguler négativement la production d'exoenzymes. Il peut y arriver en se fixant sur à la région promotrice et bloquant la fixation de CarR ou bien en titrant l'oxo-C6-HSL disponible, ce qui inhibe l'activation de CarR (Pierson III *et al.*, 1998) (fig.11).

Le transfert conjugatif chez *Agrobacterium tumefaciens*.

La bactérie pathogène de plante *A. tumefaciens* est capable de transférer, suite à des échanges de signaux entre la bactérie et son hôte, des fragments d'ADN oncogéniques provenant de son plasmide Ti (tumor-inducing) vers les noyaux des cellules végétales infectées, entraînant ainsi l'apparition de tumeurs. Cette maladie est connue sous le nom de "galle du collet". La plupart des gènes ainsi transférés dirigent la synthèse et la sécrétion des

opines (sucres) qui sont utilisées par *A. tumefaciens* comme sources nutritives. En plus des gènes *vir* nécessaires à ce transfert conjugatif avec la cellule végétale, les plasmides Ti possèdent des gènes *tra* responsables du transfert conjugatif inter-bactérien. Cette fois-ci, c'est l'entière du plasmide Ti qui est transféré. Ce transfert n'a lieu qu'au niveau des tumeurs où en présence d'opines exogènes. Les opines sont importées et catabolisées dans la cellule bactérienne grâce à la présence de perméases et d'enzymes spécifiques qui sont encodés sur le plasmide Ti (Pierson III *et al.*, 1998) (Winans *et al.*, 1999).

Il y a quelques années, des chercheurs ont découvert que des souches d'*A. tumefaciens* contenant des plasmides Ti de type octopine produisaient un composé diffusible qui stimulait la conjugaison du plasmide Ti quand elles étaient mises en présence d'octopine. Ce composé fut appelé facteur de conjugaison (CF). La purification et l'analyse chimique de ce facteur ont permis de l'identifier, c'est l' oxo-C8-HSL. La similarité structurale de ce facteur avec les autoinducteurs de *Photobacterium fisheri* et de *Erwinia carotovora*, mena à l'hypothèse que la production et la reconnaissance de cette phéromone pouvaient être similaire à celles des autres autoinducteurs (Winans *et al.*, 1999). La présence de ce système de quorum sensing chez *A. tumefaciens* permet le transfert conjugatif du plasmide Ti entre les différents individus de la population.

Des expériences de mutagenèse transpositionnelles permirent d'identifier un gène présentant une similarité de séquence avec *luxR*, *traR* (Piper *et al.*, 1993). Une souche d'*A. tumefaciens*, dépourvue de plasmide Ti mais contenant un plasmide qui exprime TraR et un autre plasmide qui possède une fusion *tra-lacZ*, exprime de grandes quantités de β -galactosidase en présence d' oxo-C8-HSL exogènes, suggérant que TraR soit le récepteur de cet auto inducteur (Piper *et al.*, 1993). Comme *traR* ressemble à *luxR* et que l'oxo-C8-HSL ressemble à l'autoinducteur de *P. fisheri*, il doit probablement exister un gène de type *luxI* qui dirige la production de la phéromone. Ce gène, *traI*, a été localisé sur le plasmide Ti. Comme pour les autres systèmes de quorum sensing, *traI* est régulé positivement par TraR, ce qui mène donc à une autorégulation positive de la production de phéromones (Hwang *et al.*, 1994). Un gène supplémentaire est impliqué dans l'expression des gènes *tra*, *traM*. L'expression de *traM* est positivement régulée par le complexe TraR-3-oxo-C8-HSL, indiquant que ce système induit son propre antagoniste et suggérant que TraM intervienne en limitant l'expression des gènes *tra* (Fuqua *et al.*, 1995).

Chez les plasmides Ti de type octopine, le gène *traR* est localisé à l'extrémité 3' d'un opéron de 14-kb induit par des octopines et positivement régulé par le régulateur transcriptionnel OccR. Ce gène *traR* est également exprimé à partir d'un second promoteur situé à mi-chemin de l'opéron, en amont du gène *msh*. Ce promoteur est régulé positivement par le complexe TraR-3-oxo-C8-HSL (Winans *et al.*, 1999) (fig 12 et 13).

Les facteurs de virulence extracellulaires de *Pseudomonas aeruginosa*.

Pseudomonas aeruginosa est une bactère pathogène opportuniste de l'homme qui cause des infections nosocomiales chez les individus immunocompromis et colonise les poumons des individus atteints de mucoviscidose. Cette bactérie produit un grand nombre de facteurs de virulence extracellulaires.

P. aeruginosa utilise au moins deux systèmes de quorum sensing pour contrôler, en réponse à sa densité cellulaire, l'expression de nombreux gènes.

Des chercheurs se sont rendus compte, en 1983, que la production d'exoprotéases chez *P. aeruginosa* était dépendante de la densité cellulaire. Le mécanisme responsable de ce contrôle fut découvert par Gambello et Iglewski, en 1991, au cours de tests de complémentation sur une souche de *P. aeruginosa* déficiente en élastase. Cette souche possédait le gène *lasB* mais ne l'exprimait pas. Des recherches supplémentaires menèrent à la découverte du gène *lasR*. Ce gène encode une protéine homologue de l'activateur transcriptionnel LuxR et suit sur le chromosome le gène *lasI*. Celui-ci encode une protéine homologue de LuxI et dirige la synthèse de la *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homosérine lactone (oxo-C12-HSL) (Gambello and Iglewski, 1991).

Ensemble, LasR et oxo-C12-HSL contrôlent un grand nombre de gènes de virulence. LasR est non seulement impliqué dans la production d'élastase, mais il intervient également dans la production de deux autres protéases, la protéase LasA et la protéase alcaline. LasR est aussi nécessaire à l'expression de l'exotoxine A. Le complexe LasR-oxo-C12-HSL contrôle enfin la transcription de *lasI* créant ainsi une autorégulation positive de la production de phéromones. Plus tard, des chercheurs constatèrent qu'il fallait une concentration en phéromone dix fois plus importante pour activer l'expression du gène *lasB* par rapport au gène *LasI*. Ils démontrèrent l'existence d'une certaine hiérarchisation dans l'activation des gènes. Finalement, ce système entraîne l'activation des gènes *xcpP* et *xcpR* qui encodent des protéines de la voie de sécrétion générale de *P. aeruginosa* (Pesci *et al.*, 1999).

La découverte d'un deuxième homologue de LuxR confirma l'existence d'un autre système de quorum sensing chez *P. aeruginosa*. Le gène qui encode cet homologue fut appelé *rhlR* pour sa capacité à réguler la production de rhamnolipides (des biosurfactants). Peu de temps après cette découverte, un deuxième autoinducteur fut identifié, le *N*-butyryl-L-homosérine lactone (C4-HSL). Un gène autre que *lasI* intervient dans sa synthèse, c'est *rhlI*. Il est localisé directement en aval de *rhlR* et encode une protéine homologue de LuxI.

L'organisation génétique de ce système est relativement similaire à celle du système *las*. Cependant, contrairement au système *las*, un des gènes cible de ce système, *rhlAB*, est localisé directement en amont de *rhlR*. Les gènes *rhlA* et *rhlB*, qui encodent une rhamnolysyltransférase intervenant dans la production des rhamnolipides, sont cotranscrits en un seul ARNm tandis que *rhlR* et *rhlI* sont transcrits à partir de leur propre promoteur.

RhlR n'est pas seulement impliqué dans la production de rhamnolipides, il intervient aussi dans la production des élastases, de la protéase LasA, de la pyocyanine et de la protéase alcaline. Le système *rhl* est donc capable d'affecter plusieurs produits de virulence. L'expression de *rhlI* est contrôlée positivement par le complexe RhlR-C4-HSL créant ainsi un feed-back positif dans lequel RhlR-C4-HSL entraîne la production de plus de phéromones. Ce complexe intervient finalement dans l'activation de la transcription de *rhlA* et de *rpoS*. RpoS est un facteur sigma impliqué dans la régulation d'un grand nombre de gènes de réponse au stress. (Table 3)

Il existe des connexions entre les deux systèmes de quorum sensing présentés ci-dessus. Tout d'abord, LasR-3-oxo-C12- HSL est capable d'activer la transcription de *rhlR*. Ceci suggère l'existence d'une certaine hiérarchisation entre les deux systèmes. Ensuite, un excès en 3-oxo-C12- HSL est capable de bloquer l'association de RhlR avec C4-HSL jusqu'à ce que suffisamment de RhlR et/ou de C4-HSL soit présent pour contrecarrer cet effet bloquant. Le système *rhl* est donc activé après le système *las*. (figure 14).

P. aeruginosa produit une autre molécule signal, 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone, qui contrôle aussi l'expression de *lasB*. La synthèse et la bioactivité de cette molécule sont médiées par les systèmes *las* et *rhl*, respectivement (Pesci *et al.*, 1999). PQS (pour *Pseudomonas* quinolone signal) fait donc partie du système de hiérarchisation. Il entraîne l'induction du gène *rhlI* et présente des effets moindres sur la transcription de *lasR* et *rhlR*. La transcription de *rhlI* et de *lasB* est permise grâce à C4-HSL et à PQS. Cette molécule agirait comme un lien entre les deux systèmes de quorum sensing (McKnight *et al.*, 2000).

Les systèmes décrits ci-dessus ont été identifiés sur base d'un phénotype « densité dépendant ». Aujourd'hui, des senseurs ont été développés et aident à la recherche de nouveaux systèmes de quorum sensing. L'utilisation de biosenseurs pour la détection d'HSL a permis la découverte de systèmes de quorum sensing médiés par les HSLs chez un grand nombre de bactéries Gram-négatives. L'accumulation d'homosérine lactones entraîne l'activation de la transcription et l'expression d'un phénotype du senseur cellulaire donné. Les senseurs bactériens utilisés pour détecter ces HSLs, n'expriment pas de synthétase mais expriment un activateur transcriptionnel homologue de LuxR et contiennent un promoteur dépendant des HSLs pour son activation et situé en amont de un ou plusieurs gènes

rapporteurs tel que *lacZ* ou *luxCDABE* (McClean *et al.*, 1997; Swift *et al.*, 1993). Etant donné que ces souches ne produisent pas de phéromones, l'expression de ces gènes rapporteurs requière l'apport d'HSLs exogènes ou d'un gène de synthétase. Les senseurs les plus simples sont des mutants de synthétase provenant de souches régulant une caractéristique mesurable par le quorum sensing. Par exemple, une bactérie de type *P. fischeri* mutée dans son gène *luxI*, ne produira de la lumière qu'en présence d' oxo-C6-HSL exogènes et de composés fortement apparentés... Chaque régulateur est capable d'être activé par une palette d'HSL similaires. Cependant, pour couvrir toute la gamme d'HSL connues, il faut utiliser plusieurs senseurs différents. C'est comme ça que sont apparus les plasmides senseurs portant différentes combinaison de gènes rapporteurs et permettant de détecter un grand nombre de phéromones différentes.

3.4. Les acteurs du quorum sensing.

Les N-acylhomosérine lactones.

Ces signaux chimiques synthétisés par les bactéries font partie d'un groupe de substances nommées métabolites secondaires. A l'inverse des métabolites primaires tels les acides aminés et les vitamines, les métabolites secondaires ne sont pas indispensables à la survie et à la croissance des cellules bactériennes (Dunlap, 1997).

Si plusieurs espèces bactériennes utilisent une acyl-HSL identique à celle de *P. fischeri*, oxo-C6-HSL, il existe toute une famille d'homosérines lactones différant par leur taille et leur substitutions (fig.15). Toutes ces acyl-HSLs sont constituées d'une partie commune : l'anneau lactone. Celui-ci est reliée par un lien amide à une chaîne acyl de 4 à 14 carbones. Cette dernière partie varie quant à sa longueur, sa substitution et son état de saturation. Un premier site de variation se retrouve en troisième position sur la chaîne acyl, il peut être occupé par un groupe cétone, un hydroxyl ou être entièrement réduit. Certaines phéromones peuvent également présenter une liaison insaturée dans leur chaînes acyl. La présence de cette liaison entraîne, vraisemblablement, de sévères restrictions dans la conformation de cette partie de la molécule, comme ce serait le cas également avec différents états d'oxydation en troisième position.

Ces phéromones sont capables de diffuser passivement à travers les membranes bactériennes selon un gradient de concentration. Cette supposition est basée sur le fait que l'autoinducteur de *P. fisheri* radiomarké, [^3H]oxo-C6-HSL, diffuse librement à l'intérieur et vers l'extérieur de *P. fisheri* et de *E. coli*. Chez *Pseudomonas aeruginosa*, le transport des deux autoinducteurs, *N*-(3-oxododecanoyl) homosérine lactone (oxo-C12-HSL) et *N*-butyryl homosérine lactone (C4-HSL), a été étudié en utilisant des signaux marqués au tritium. Lorsque [^3H]C4-HSL est ajouté à des cellules de *P. aeruginosa* en suspension, la concentration cellulaire atteint un état stable en moins de 30 s et devient presque égal à la concentration externe, comme attendu pour un composé diffusible. Par contre, [^3H]oxo-C12-HSL demande environ 5min pour atteindre un état stable et la concentration cellulaire est trois fois plus importante que la concentration externe. L'inhibition du gradient de proton entraîne une forte augmentation de la concentration cellulaire en [^3H]oxo-C12-HSL, suggérant l'implication d'un efflux actif. Les gènes encodant la pompe impliquée dans cet efflux actif sont *mexA-mexB-oprM*. Apparemment, la longueur et/ou le degré de substitution de la chaîne latérale acyl détermine la capacité de diffusion passive de l'HSL. La présence de pompe à efflux pourrait influencer le type d'HSL utilisable (Pearson *et al.*, 1999).

Le fait que plusieurs espèces bactériennes puissent utiliser des systèmes de communication basés sur un signal homologue, pose l'hypothèse de l'existence d'une communication interspécifique. Les bactéries seraient ainsi capables de moduler leur propre comportement en réponse à la présence d'autres espèces.

Par exemple, chez *Pseudomonas aureofaciens*, le quorum sensing régule la production d'antibiotiques de type phénazine. Cette production est contrôlée non seulement par l'auto inducteur de *P. aureofaciens* mais également par des signaux sécrétés par d'autres espèces bactériennes (Pierson III *et al.*, 1998). *P. aerofaciens* peut ainsi détecter les bactéries susceptibles d'entrer en compétition avec elle pour les nutriments et produire des phénazines pour les éliminer.

De plus, *Burkholderia cepacia* et *P. aeruginosa* sont des bactéries pathogènes opportunistes de l'homme, qui affectent les poumons des patients atteints de mucoviscidose. Généralement, *B. cepacia* ne colonise les poumons qu'après infection par d'autres microorganismes. Dans 80% des cas, la co-colonisation s'effectue en présence de *P. aeruginosa*. Ensemble, elles entraînent une rapide détérioration du poumon accompagnée de fièvres. Une des explications pourrait être que chacune augmente en synergie les déterminants de virulence de l'autre, facteurs de virulence régulés dans les deux cas par un système de quorum sensing. La détection des HSL produites par l'autre espèce semble être un signal déclencheur de la production de ces déterminants (McKenney *et al.*, 1995).

LuxI et ses homologues.

Chez la majorité des bactéries Gram-négatives où un système de quorum sensing est découvert, les acyl-homosérine lactones sont synthétisées via l'activité d'une acyl-homosérine lactone synthétase présentant des homologies de séquence avec la protéine LuxI de *P. fischeri*. En général, l'expression de ce genre de protéine dans des hôtes tels que *E. coli* mène à la synthèse de la ou des HSLs apparentées (en effet, une synthétase peut produire plusieurs HSL différentes), suggérant que ce soit ces protéines qui déterminent la spécificité des substrats employés pour la synthèse et que les précurseurs soient des métabolites communs. Les comparaisons des séquences en acides aminés de ces différentes protéines homologues de LuxI ont fourni quelques aperçus de la fonction de ces protéines. Le niveau de conservation à l'intérieur de cette famille s'étend de 28 à 34% d'identité (de plus fortes homologies sont observées pour des homologues provenant d'organismes très étroitement apparentés, tel que différents isolats de *Erwinia* spp. ou d'*A. tumefaciens*). Bien que des résidus conservés soient dispersés un peu partout dans la séquence de ces homologues, il y en a dix qui sont invariants et qui se retrouvent dans l'extrémité amino-terminale de ces protéines (résidus 25 à 104 en se référant à la séquence de LuxI) (Fuqua and Eberhard, 1999). Un grand nombre d'autres positions sont très conservées ou tout au moins contiennent des acides aminés présentant des caractéristiques similaires. L'extrémité carboxy-terminale de ces synthétases, bien que ne possédant pas d'acides aminés absolument conservés, contient quand même des résidus qui sont hautement conservés ou structuralement conservés (par exemple, la région située entre les résidus 153 et 159).

La structure des autoinducteurs suggère qu'ils soient synthétisés à partir de précurseurs d'acides gras et d'acides aminés. Les substrats utilisés pour la synthèse d'HSL sont la S-adénosylmethionine (AdoMet) et l'acide gras approprié associé à sa protéine porteuse (ACP). Il ont été identifiés grâce à la synthèse d'HSL in vitro, au départ de TraI purifiée (More *et al.*, 1996). Les résultats obtenus ont été confirmés par la suite avec deux autres synthétases LuxI et RhII (Fuqua *et al.*, 1996; Schaefer *et al.*, 1996).

Le modèle de Moré est toujours d'actualité. Tout d'abord, LuxI se lie à l'acyl-ACP et à l'adénosylméthionine. Il s'ensuit une attaque nucléophile du groupement aminé de AdoMet sur le groupement carbonyle de la chaîne acyl. Cette réaction permet de lier ces deux substrats via la formation d'un lien amide. C'est dans la région de la protéine s'étendant du résidu 25 au résidu 104 que semble se former ce lien amide. Celle-ci pourrait représenter le site actif de l'enzyme, ce qui expliquerait qu'elle soit aussi bien conservée. La cyclisation de l'AdoMet libère le 5'-méthylthioadénosine (MTA) et donne l'HSL finale. Ce mécanisme est loin d'avoir été élucidé dans son entièreté, beaucoup de questions restant encore sans réponse. (fig.16).

Un cas d'évolution convergente. *Photobacterium harveyi* est une bactérie marine luminescente qui possède deux systèmes d'autoinduction fonctionnant en parallèle pour contrôler l'expression de l'opéron *luxCDABE*. Le premier système implique une acyl-homosérine lactone, *N*-(3-hydroxybutyryl)HSL ; la structure du signal intervenant dans le second système n'est pas connue (ce n'est en tout cas pas une acyl-homosérine lactone). Deux gènes interviennent dans la synthèse de la *N*-(3-hydroxybutyryl)HSL, *luxL* et *luxM*. Les produits de ces gènes ne montrent pas de similarité avec la protéine LuxI ou l'un de ses homologues. Ceci pose l'hypothèse de l'existence d'une seconde famille d'enzymes capables de synthétiser des homosérine lactones.

LuxR et ses homologues.

Des mutations ponctuelles aléatoirement générées dans le gène encodant LuxR ont permis de déterminer quelles étaient les régions essentielles à sa fonction (fig.17). Les mutations critiques se retrouvent en deux endroits (résidus 79 à 127 et résidus 184 à 230). Des analyses supplémentaires indiquent que LuxR est constitué de deux domaines. Un domaine N-terminal de liaison à l'HSL et un domaine C-terminal de liaison à (Choi and Greenberg, 1991 ; Choi and Greenberg, 1992).

Le domaine N-terminal constitue les deux premiers tiers de la protéine. Des expériences ont montré que l'autoinducteur se liait à ce domaine et modulait ainsi l'activité du domaine C-terminal. Le domaine N-terminal n'est supposé lier l'auto inducteur que lorsque ce dernier a atteint une concentration de l'ordre du nanomolaire (Stevens *et al.*, 1999).

LuxR serait associé au feuillet interne de la membrane cytoplasmique. Il existe d'autres exemples de régulateurs transcriptionnels également associés à la membrane cytoplasmique, c'est le cas de TraR (chez *A. tumefaciens*), ToxR (chez *Vibrio cholerae*), NodD (chez *Rhizobium leguminosarum*) (Kolibachuk and Greenberg, 1993). Bien que la nature précise et la signification de cette association ne soient pas déterminées, il semble que le domaine N-terminal soit impliqué. Beaucoup de choses restent à découvrir concernant la liaison du régulateur transcriptionnel à son ligand et son activation. Un des modèles proposés est que, comme pour certains régulateurs de systèmes à deux composantes, le domaine N-terminal empêche la fixation du domaine C-terminal à l'ADN.

Une fois que l'autoinducteur approprié s'est fixé au domaine de régulation N-terminal, il stabilise la forme dimérique de LuxR et le domaine C-terminal peut activer la transcription. La région intervenant dans cette multimérisation se situerait entre les résidus 116 et 160 (Choi

and Greenberg, 1992). Récemment, deux équipes ont démontrés que l'état dimérique du régulateur préexistait à la liaison à l'HSL. De plus, la stoéchiométrie de liaison est d'une HSL par monomère (Welch *et al.*, 2000). Ces évidences expérimentales renforcent l'hypothèse de la stabilisation de l'état dimérique par l'HSL, ce qui entraîne une fixation efficace du dimère sur l'ADN.

Le domaine C-terminal, constituant le dernier tiers de la protéine, peut fonctionner comme un activateur transcriptionnel indépendamment de l'autoinducteur (Choi and Greenberg, 1991) ; (Stevens *et al.*, 1994). L'étude de ce domaine a permis de découvrir que LuxRAN et σ^{70} étaient les seuls éléments nécessaires à l'activation de la transcription (Stevens *et al.*, 1994). Un motif hélice-turn-hélice s'étend du résidu 196 au résidu 210 (Kahn and Ditta, 1991). Des chercheurs ont découvert que des mutants de LuxR, qui ne possédaient plus d'extrémité C-terminale, ne pouvaient plus activer les gènes de luminescence chez *E. coli*, mais gardaient leur fonction autorégulatrice. Ils supposèrent que la région située entre les résidus 230 et 250 était nécessaire à l'activation transcriptionnelle mais pas pour la liaison à l'ADN (Choi and Greenberg, 1992).

La comparaison des séquences protéiques des homologues de LuxR avec LuxR lui-même révèle un pourcentage de conservation faible (environ 25% d'identité pour des alignements pairés). Deux régions montrent néanmoins plus d'identité, le motif hélice-turn-hélice au niveau du domaine C-terminal et la région du domaine N-terminal (résidus 79 à 127) (Shadel *et al.*, 1990 ; Slock *et al.*, 1990) associée à la liaison à l'autoinducteur (Fuqua *et al.*, 1996).

L'organisation génétique.

En règle générale, le gène de la synthétase et du régulateur sont colocalisés dans la même région génomique. L'orientation des deux gènes et la distance qui les sépare varie chez les différents espèces (Figure 18) (Salmond *et al.*, 1995). Cependant, les deux gènes peuvent être distants, comme c'est le cas chez *A. tumefaciens*. De plus, il existe au moins un exemple (*E. carotovora*) où plusieurs régulateurs existent pour une seule synthétase.

Chez *P. fisheri*, les gènes *luxI* et *luxR* sont reliés aux gènes qu'ils régulent (*luxCDABE*). Cependant, une telle organisation génétique n'est pas obligatoire. Chez *E. carotovora*, les gènes régulés par le couple ExpI/CarR ne se situent pas en aval d'*expI*.

La région régulatrice lux est constituée de 219pb, elle contient le promoteur de luxR (où les régions -10 et -35 sont similaires aux séquences consensus des promoteurs propres à *E.*

coli) et le promoteur de l'opéron lux (avec une région -10 identifiée par comparaison avec les séquences consensus de *E. coli*). En amont du start de transcription de l'opéron lux, se trouve une séquence de 20pb inversément répétée, la boîte lux. Des expériences de mutagenèse dirigées ont montré que cette boîte était nécessaire à l'activation de la transcription de l'opéron par LuxR et constituait le site de liaison de la protéine LuxR (Devine *et al.*, 1989). Une séquence consensus a pu être déterminée sur base d'un alignement des séquences situées en amont des promoteurs régulés par LuxR (Fuqua *et al.*, 1994). Un autre site de liaison est également présent en amont du promoteur de luxR en position -59, c'est celui de la protéine réceptrice de l'AMPc (crp). La présence d'une boîte fnr a également été constatée, elle constituerait le site de liaison de la protéine FNR nécessaire à l'expression de LuxR. (fig.19).

3.5. Les fonctions régulées par le quorum sensing.

Les phénotypes associés à la régulation par les *N*-acyl-homosérine lactones sont physiologiquement très divers, il y a la bioluminescence, la synthèse d'enzymes extracellulaires, la virulence, la production d'antibiotiques et le transfert conjugatif de plasmides. Chez certaines bactéries, de nombreux traits phénotypiques sont régulés par la même molécule, par exemple, chez certaines souches de la bactérie pathogène de plante *Erwinia carotovora*, oxo-C6-HSL régule la synthèse de nombreuses pectate lyases, polygalacturonase, cellulase, protéase et d'un antibiotique carbapène. Toutes ces *N*-AHL régulent des phénotypes appartenant au métabolisme secondaire, c'est à dire que les fonctions régulées ne sont pas essentielles à la survie et à la croissance *in vitro* des cellules bactériennes, en conséquence les *N*-AHL sont considérées comme des molécules non essentielles.

Certaines espèces pathogènes possèdent un système de quorum sensing régulant des facteurs de virulence. Ceci est confirmé par l'existence de mutants pour le quorum sensing montrant une atténuation significative de leur virulence. C'est par exemple le cas pour *P. aeruginosa* chez qui des mutations affectant le régulateur transcriptionnel entraînent l'apparition d'un phénotype moins virulent (Tang *et al.*, 1996). Chez ces mêmes bactéries associées à un biofilm, on a pu constater qu'un défaut de production en HSLs était corrélé avec une absence de structure tridimensionnelle du biofilm. L'hypothèse est que le quorum sensing régule la production de la matrice exopolysaccharidique, responsable de la cohésion du biofilm (Davies *et al.*, 1998). Grâce aux HSL, les bactéries sont capables de ressentir la taille de leur population et de retarder l'expression de gènes spécifiques jusqu'à ce qu'une densité cellulaire critique soit atteinte. Elles retardent l'expression de leur facteur de virulence qui pourraient

alerter les défenses immunitaires de l'hôte jusqu'à ce que la population bactérienne soit suffisamment importante pour contrer ces défenses. De cette manière, les bactéries augmentent leur chance de produire une infection productive.

3.6. Les Quorum sensing blocker (QSB's).

Le fait d'interférer avec la transmission du message moléculaire en utilisant un antagoniste qui entrerait en compétition avec la phéromone pour son site de liaison sur le régulateur transcriptionnel, et empêcherait ainsi l'activation des gènes de virulence, offrirait une stratégie attrayante pour le traitement ou la prévention des infections. Il a été montré que des analogues de C6-HSL pouvaient inhiber l'action de C6-HSL chez *P. fisheri* (Eberhard *et al.*, 1986). La relative facilité avec laquelle des analogues de C6-HSL peuvent être synthétisés rend le fait d'évaluer l'influence d'un antagoniste sur le cours de l'infection expérimentalement réalisable. Grâce aux récentes études effectuées sur LuxI et ses homologues, la synthétase est devenue une cible potentielle de ce genre d'approche rationnelle. Il est probable que d'autres bactéries emploient ces systèmes de communication basés sur des phéromones pour promouvoir la conjugaison et la dispersion non seulement de plasmides portant des facteurs de virulence mais aussi de plasmides conférant la résistance aux antibiotiques. Des antagonistes des phéromones pourraient ici empêcher la dispersion de la résistance aux antibiotiques.

Les bactéries ont donc la possibilité de moduler leur phénotype en réponse à des changements de densité de population. En médecine, le quorum sensing offre une cible attrayante pour la découverte de nouveaux agents antimicrobiens qui courtcircuiteraient la voie de transduction du signal en interférant avec les fonctions des AHLs. Ce concept de bloquer la communication cellulaire en utilisant des antagonistes pourrait également s'appliquer aux bactéries pathogènes Gram-positives, chez qui des peptides remplacent les AHLs.

Il existe également des bloquants naturels du quorum sensing. Le premier exemple découvert sont les furanones halogénées produites par l'algue rouge *Delisea pulchra* (Manefield *et al.*, 1999) (figure 20). Ces molécules se fixent au site de liaison à l'HSL sur les régulateurs de quorum sensing et inhibent leur activation. La production de ces agents bloquants permet à l'algue d'empêcher la colonisation de ses « feuilles » par des biofilms bactériens.

Récemment, Dong *et al.* ont découvert qu'un isolat bactérien de *Bacillus* sp. était capable d'inactiver enzymatiquement les autoinducteurs. Le gène responsable de cette

inactivation a été cloné et encode une protéine de 250 acides aminés contenant un motif de liaison au zinc que l'on retrouve chez un grand nombre de metallohydrolases. L'expression de ce gène dans une souche transformée de *Erwinia carotovora* entraîne une réduction significative de la libération de l'autoinducteur, diminue l'activité des enzymes pectoliques extracellulaires et atténue la pathogénicité. Cette découverte représente une stratégie prometteuse pour la prévention des maladies où la virulence est régulée par un ou plusieurs autoinducteurs (Dong *et al.*, 2000).

4. *Brucella* sp. bactérie pathogène.

Les bactéries du genre *Brucella* sp. sont des coccobacilles Gram-négatifs immobiles, asporulés et strictement aérobies de 0.5 à 0.7 µm de large et de 0.6 à 1.5 µm de long, appartenant à la subdivision α2 de la classe des *Proteobacteriae* (Moreno *et al.*, 1990). Ces bactéries sont des parasites intracellulaires facultatifs responsables d'une zoonose de répartition mondiale.

Le genre *Brucella* est divisé en 6 espèces: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* et *B. neotomae*. L'identification des espèces de *Brucella* sp. est basée sur deux types de propriétés: la sensibilité à certains phages et le profil d'oxydation d'une série d'acides aminés et de sucres. Pour l'identification des biovars au sein des espèces, des tests biochimiques et des tests d'agglutination par des anticorps spécifiques sont utilisés (Alton *et al.*, 1988).

Verger *et al.* proposent en 1985 de rassembler les *Brucella* sp. en une seule espèce, *B. melitensis*. Des expériences d'hybridation d'ADN ont montré que les différents espèces de *Brucella* présentaient une identité supérieure à 87%.

Le génome de *Brucella* sp. a une taille d'environ 3.1×10^6 paires de bases et son contenu en G et C est élevé (57-59%) (Moreno, 1998). Il serait constitué de deux chromosomes circulaires de 2100 et 1150 kb (Allardet-Servent *et al.*, 1991 ; Michaux *et al.*, 1993).

La paroi des bactéries Gram-négatives est constituée d'une membrane interne (cytoplasmique) et d'une membrane externe, séparées par l'espace périplasmique contenant le peptidoglycane. La membrane externe est asymétrique : le feuillet interne contient les phospholipides alors que le feuillet externe est constitué de lipopolysaccharides (LPS). Le LPS est formé de trois parties : - le lipide A servant d'ancrage membranaire

- une courte série de sucres, le core
- une longue chaîne de sucres, la chaîne O.

Chez *Brucella* sp. comme chez beaucoup de bactéries Gram-négatives, deux types de LPS sont observés, le "rough" dépourvu de chaîne O confère aux colonies un phénotype rugueux et le smooth contenant une chaîne O un phénotype lisse (Godfroid *et al.*, 1998).

La brucellose humaine (ou fièvre de Malte ou encore fièvre ondulante) s'accompagne de divers symptômes non-spécifiques à l'infection tels que la fièvre, les sueurs, l'anorexie, l'asthénie, des problèmes articulaires et musculaires. Le traitement actuel pour l'homme est basé sur la prise de doses importantes de doxycycline et de rifampicine. L'homme s'infecte par contact direct avec un animal brucellique ou suite à la consommation de produits contaminés (comme le lait cru). Si elle n'est pas soignée correctement, la brucellose peut entraîner la mort.

Chez les animaux, les principales conséquences de l'infection brucellique sont l'avortement chez les femelles gestantes et la stérilité chez les mâles. La dissémination de la bactérie pathogène se fait lors des avortements de femelles contaminées, ainsi que par le lait, les matières fécales, les sécrétions vaginales ou par contamination *in utero*.

BUT DU MEMOIRE.

Des éléments d'un système de quorum sensing ont récemment été identifiés chez la bactérie utilisée au laboratoire : *Brucella*. Une homosérine lactone a été découverte à partir du surnageant de culture de *Brucella melitensis* 16M, la C12 HSL. C'est la première mise en évidence d'une phéromone de type lactone d'homosérine chez une bactérie Gram-négative à tropisme intracellulaire. Cette découverte confirme l'existence d'un système de quorum sensing chez *Brucella* sp.

De plus, suite à un criblage effectué pour rechercher les différents acteurs impliqués dans ce système, une protéine présentant des similarités de séquence avec des régulateurs connus du quorum sensing a été identifiée chez *Brucella abortus* 544 et chez *Brucella melitensis* 16M, BabR (*Brucella abortus* régulateur).

Le but de ce mémoire est de créer un mutant du régulateur transcriptionnel de *Brucella melitensis* impliqué dans le quorum sensing.

Les avantages d'obtenir une telle construction sont multiples. Tout d'abord, examiner le phénotype du mutant peut donner des indications concernant les rôles éventuels joués par ce régulateur chez *Brucella*. Afin de trouver les liens possibles entre ce régulateur et les effets de l'HSL découverte chez *Brucella*, un mutant permettra de vérifier si les effets de l'HSL s'observent toujours en l'absence de babR. On pourra tester l'importance de BabR dans la virulence de *Brucella*...

Deux stratégies ont été envisagées pour l'obtention de ce mutant. Tout d'abord, la création d'un délétant et ensuite celle d'un disruptant intégratif. Ces deux approches ont été réalisées en parallèle afin de pallier à un éventuel problème survenant d'un côté ou de l'autre. Si jamais l'une des deux stratégies s'avèrent infructueuses, on se concentrera alors sur la suivante.

Le délétant résultera de l'insertion d'une copie déletée de *babR* présente sur un plasmide mobilisable et non répliquatif chez *Brucella melitensis* 16M. L'obtention de ce mutant nécessitera un double événement de recombinaison. Par contre, l'intégration d'un plasmide contenant un fragment interne de *babR* mènera à la création de deux copies incomplètes du gène. Cette seconde approche a l'avantage de ne nécessiter qu'un seul événement de recombinaison.

RESULTATS ET DISCUSSION.

1. Construction d'un délétant.

Le mutant *babR* peut-être obtenu en remplaçant la copie sauvage du gène par une autre copie où un fragment interne a été remplacé par la cassette de résistance à la kanamycine.

La démarche envisagée est la suivante. La région d'ADN génomique contenant *babR* sera clonée dans un vecteur mobilisable non répliatif chez *Brucella*. La construction obtenue, à l'exception d'une partie interne de l'ORF encodant BabR, sera amplifiée par PCR. Le gène *kan* sera inséré à la place de ce fragment interne pour donner une copie délétée de *babR*. Après transfert conjugatif de cette construction chez *Brucella melitensis* 16M, les clones délétants seront sélectionnés et leur phénotype évalués.

1.1. Construction du plasmide pBluescript SKoriT *babR*.

La construction du plasmide pBluescript SK oriT *babR* a été réalisée en insérant un fragment de 1212 pb contenant le gène *babR* avec son promoteur, dans la matrice plasmidique du pBluescript SK oriT (figure 1).

Le plasmide pSK oriT C7 est un sous-clone provenant d'une banque d'ADN génomique de *Brucella abortus* construite au laboratoire. Il contient un insert d'environ 5 kb où l'on retrouve le gène *babR*. La restriction de ce plasmide par l'enzyme *EcoRV* génère notamment un fragment de 1212 pb contenant le gène *babR*. Ce site de restriction a été choisi car il permettait de générer un fragment de taille raisonnable. Les différents fragments ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose et le fragment d'intérêt a été récupéré (figure 2).

Le plasmide pSK oriT Amp^R a été linéarisé par *EcoRV*, ce qui le rend compatible avec le fragment contenant *babR*. La matrice et le gène ont été mis en présence dans un tampon de ligation contenant la T4 DNA ligase. Afin de favoriser l'intégration du fragment contenant *babR* dans le pSK oriT, les molécules d'insert ont été mises en large excès. Une souche de *E. coli* XL1-Blue compétente a été transformée avec le mélange de ligation et étalée sur milieu sélectif LB contenant Amp Xgal IPTG.

Après une nuit d'incubation à 37°C, deux colonies blanches ont été obtenues, leur ADN plasmidique a été extrait par miniprep. L'analyse en gel d'agarose de ces miniprep a été réalisée, après restriction par *EcoRI* et *BstEII*. La restriction attendue du plasmide par l'enzyme *EcoRI* doit générer trois fragments de 3196, 901 et 307 paires de bases. La figure 3 montre que la restriction par *EcoRI* génère un profil de migration correct pour les deux clones. L'enzyme *BstEII* ne coupe pas dans le plasmide pSK oriT, mais coupe une fois le gène *babR*. La restriction attendue par *BstEII* doit générer la linéarisation (4404bp), preuve de l'insertion de *babR* dans le pSK oriT. Une linéarisation du plasmide, suite à la restriction *BstEII*, n'a été observée que pour le clone 1 (figure 3). Etant donné que le profil de restriction observé pour l'autre clone n'était pas clair, une deuxième restriction par *BstEII* de ce candidat a été réalisée et a entraîné cette fois-ci la linéarisation du plasmide (résultat non montré).

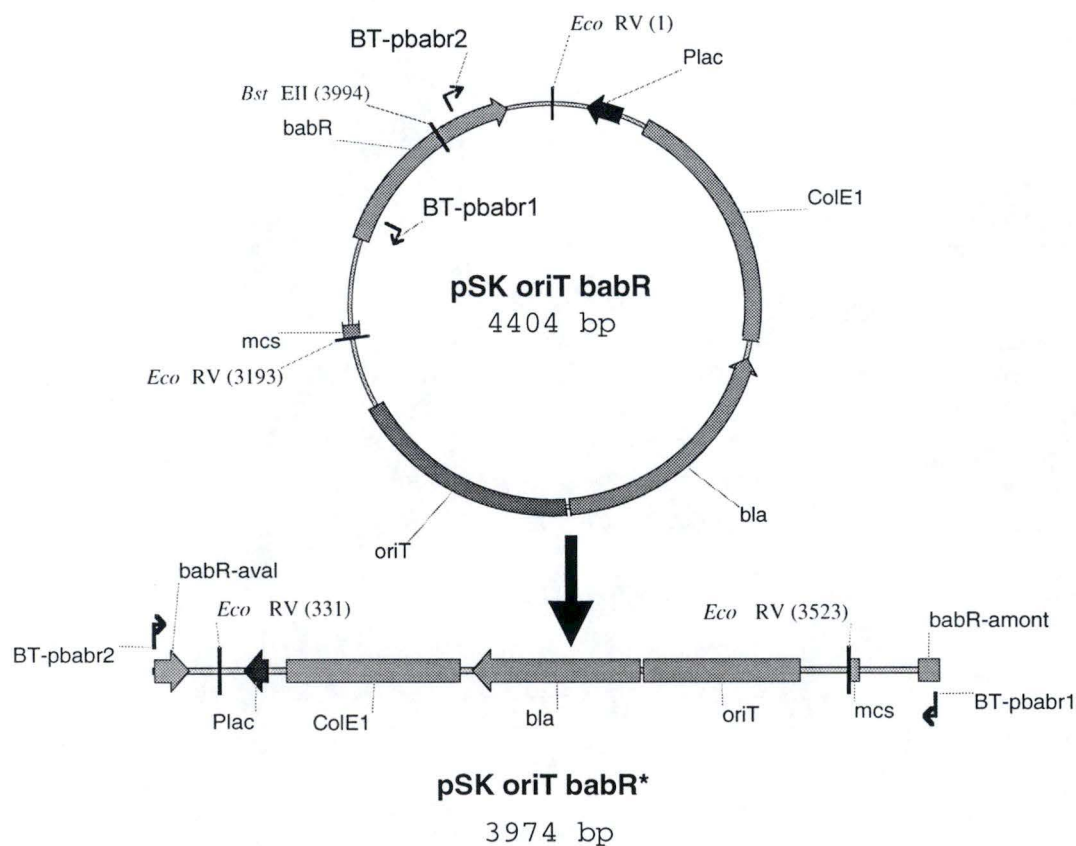
1.2. Amplification par PCR du pSK oriT et d'une partie du régulateur.

Etant donné qu'il n'existe pas de site de restriction permettant de supprimer une partie interne de l'ORF sans toucher au plasmide et à la cassette *kan*, une autre technique a été envisagée, la PCR.

Des amorces nucléotidiques ont été définies sur base de la séquence du gène *babR*. Elles viendront s'hybrider de part et d'autre du site unique de restriction *BstEII*. Ces amorces divergentes vont permettre d'amplifier le plasmide pSK oriT *babR* dans son entièreté à l'exception d'un fragment interne appartenant au gène *babR* (figure 4a). Ce produit de PCR sera appelé pSK oriT *babR**. Ces amorces sont phosphorylées, ce qui permettra la ligation avec un autre produit PCR, et portent les noms suivants, BT-pbabr1 et BT-pbabr2 (leurs séquences sont reprises à la table 1). Le fragment interne non amplifié par PCR, d'une taille d'environ 430bp, contient les régions les plus conservées du domaine N-terminal intervenant dans la liaison à l'autoinducteur. La PCR a été réalisée avec le kit expand high fidelity PCR system (Roche). Celui-ci tire partie d'un mélange de deux polymérases (Pwo et Taq) qui permet l'amplification de fragments de grandes tailles. Le matrice plasmidique a été linéarisée au préalable par *BstEII*. Les conditions utilisées sont les suivantes :

- Dénaturation de 2 min à 95°C
- 30 cycles d'amplification divisés en trois étapes :
 - 30 sec. à 95°C pour la dénaturation
 - 30 sec. à 62°C pour l'hybridation
 - 2 min. à 72°C pour la polymérisation.
- Elongation finale de 7 min. à 68°C.

A



B

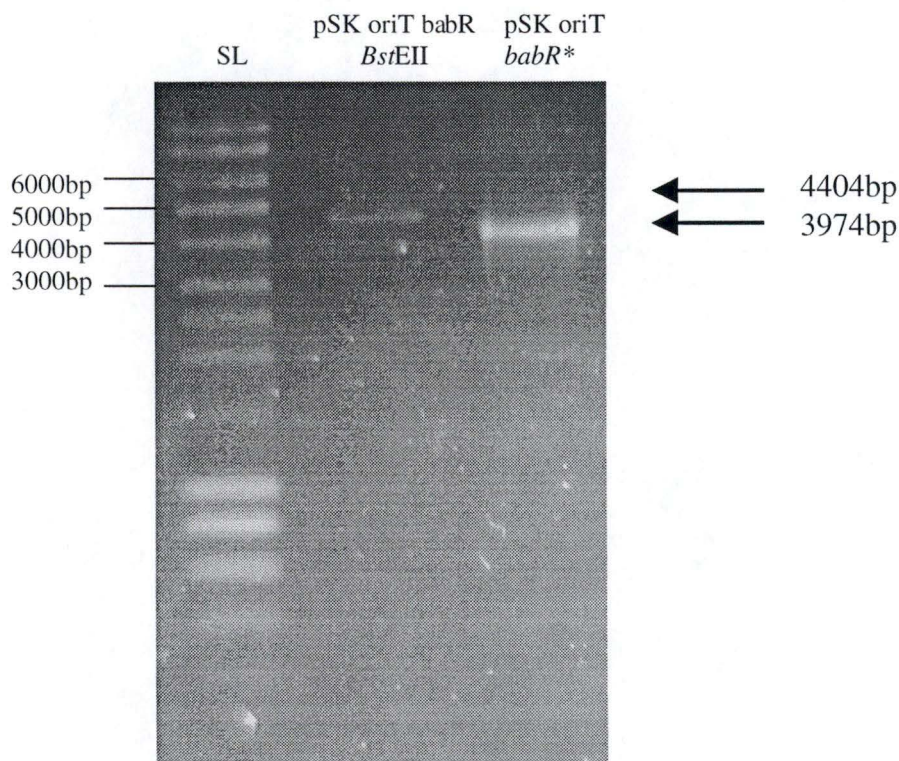


Figure 4 : A. Stratégie d'amplification du pSK oriT babR sans un fragment interne de babR. La PCR est effectué avec deux amorces nucléotidiques divergentes (BT-pbabr1 et BT-pbabr2), définies de part et d'autre du site de restriction *BstEII*.

B. Comparaison de la taille du plasmide pSK oriT babR (linéarisé par l'enzyme *BstEII*) et de pSK oriT *babR** correspondant au plasmide précédent sans un fragment interne de babR. SL : marqueur de poids moléculaire « Smart ladder » (Eurogentec).

Les tailles de la matrice de départ et du produit PCR ont été comparées en gel d'agarose 0,8% (figure 4b). On peut constater que la taille de pSK oriT *babR** (3974 pb) est inférieure à celle de la matrice plasmidique (4404 pb).

1.3. Amplification par PCR de la cassette *kan*.

La cassette *kan* va maintenant être insérée dans ce plasmide entre les deux extrémités du gène encodant le régulateur. Pour ce faire, elle a d'abord été amplifiée par PCR, à partir du plasmide pUC4 *kan*, avec la Pwo polymérase. Les amorces utilisées porteront les noms de kan-amont et kan-aval. La Pwo polymérase permet de générer des produits PCR à bouts francs. Le programme utilisé pour la PCR est le suivant :

- Dénaturation de 5 min à 95°C
- 30 cycles d'amplification divisés en trois étapes :
 - 30 sec. à 90°C pour la dénaturation
 - 45 sec. à 53°C pour l'hybridation
 - 1 min. à 72°C pour la polymérisation.
- Elongation finale de 10 min. à 72°C.

Un aliquot des différents produits PCR a ensuite été analysé par électrophorèse en gel d'agarose 1%. La figure 5 présente le résultat obtenu, la bande de taille attendue (945pb) apparaît.

1.4. Clonage de *kan* dans pSK oriT *babR**.

Les deux produits PCR, la cassette *kan* et le pSK oriT *babR**, ont été mis en présence dans un tampon de ligation et incubés avec la T4 DNA ligase pendant 4 heures à température ambiante. Le rapport des fragments en présence est de 4 pour 1 (4 molécules de *kan* pour 1 molécule de pSK oriT *babR**). Le mélange de ligation a ensuite été purifié avec le kit de purification pour produits PCR et resuspendu dans un volume total de 50µl d'eau. Des bactéries *E. coli* DH5α électrocompétentes ont été transformées avec ce mélange et étalées sur un milieu sélectif LB Amp Kan. Seules les bactéries transformées par un plasmide portant les marqueurs de résistance à l'ampicilline et à la kanamycine pousseront.

Après une nuit d'incubation à 37°C, deux clones ont été obtenus. Ils ont été isolés sur un milieu LB Amp Kan et leur ADN plasmidique a été extrait par miniprep. Une restriction diagnostique par *HindIII* a été effectuée et analysée par électrophorèse en gel d'agarose 1%

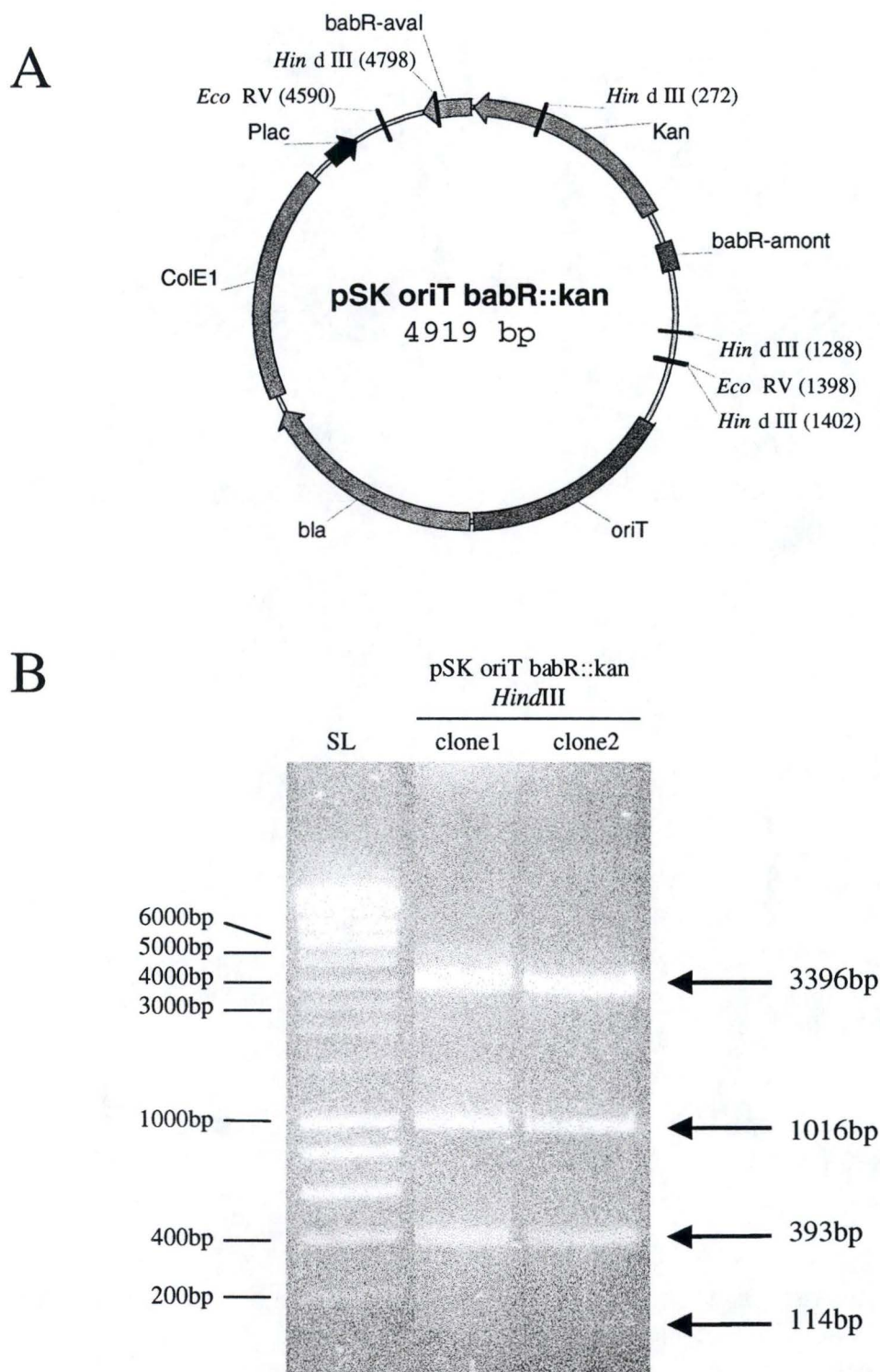


Figure 6 : A. Représentation du plasmide pSK oriT *babR::kan*.

B. Restriction analytique, par l'enzyme *HindIII* des deux constructions pSK oriT *babR::kan*. Le profil de restriction observé correspond, dans chaque cas, à l'insertion de la cassette *kan* dans le sens inverse du Plac (montrée au point A.). SL : marqueur de poids moléculaire « Smart ladder » (Eurogentec).

(figure 6B). La taille des fragments obtenus (3396, 1016, 393 et 114 pb) indique que la cassette *kan* s'est insérée en sens inverse du *Plac* pour former le pSK oriT *babR::kan* (figure 6A).

Afin de permettre le transfert conjugatif de ce plasmide chez *Brucella*, il a été introduit par électroporation dans une souche donneuse de *E. coli* S17 λ pir.

1.5. Conjugaison : *E coli* S17 \rightarrow *B. melitensis* 16M.

Cette étape va permettre de remplacer le gène d'intérêt, *babR*, par son homologue disrupté. Ceci ne sera possible que si un double événement de recombinaison se passe (figure 7).

Le plasmide pSK oriT *babR::kan* a donc été transféré dans la souche *B. melitensis* 16M (Nal^R) (où il est non répliquatif) par conjugaison avec des *E. coli* S17 λ pir. Les cellules ont ensuite été placées sur des milieux sélectifs 2YTagar contenant de l'acide nalidixique et de la kanamycine, dans le but de ne garder que les *Brucella* qui ont subi un ou plusieurs événements de recombinaison. Les *Brucella* receveuses sont des mutants naturellement résistants à l'acide nalidixique. Les *Brucella* qui pousseront seront repiquées ensuite sur un milieu 2YT Kan Amp afin de discerner les simples recombinants (intégrants) des doubles recombinants (délétants).

Après trois jours d'incubation à 37°C, tous les candidats observés poussent sur milieu Nal Kan Amp. Ceci résulte de l'intégration du plasmide dans le génome. Il n'y a donc pas eu double recombinaison et délétion.

1.6. Discussion.

Suite à cette conjugaison, tous les candidats obtenus n'ont subi qu'un seul événement de recombinaison et ont donc intégré le plasmide dans son intégralité, reformant ainsi une copie intacte du gène encodant BabR (figure 7).

A ce stade du travail, plusieurs hypothèses peuvent être avancées. On peut envisager que le gène encodant BabR est un gène essentiel à la bactérie. Il régule peut-être l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire ou dans le métabolisme et empêcherait ainsi la croissance et la survie des bactéries. Ceci permettrait d'expliquer le fait qu'aucune colonie, ayant subi un double événement de recombinaison, n'ait été obtenue lors de cette conjugaison. Cependant, il ne s'agirait ici que d'une évidence négative de ce caractère essentiel.

De plus, les conditions de la conjugaison pourraient être optimisées. Les variables susceptibles d'être prises en compte sont le temps réel de la conjugaison (la période durant laquelle les échanges entre bactéries donneuses et receveuses s'opèrent) ou le rapport des quantités de bactéries donneuses et receveuses mises en présence. Le but est de favoriser les doubles événements de recombinaisons, dont la probabilité d'apparition est moindre que celle des simples recombinaisons.

Etant donné que les stratégies de délétions et de disruption intégrative ont été réalisées en parallèle, l'optimisation des conditions de la conjugaison n'ont pas été effectuées et ce, par manque de temps.

2. Construction d'un disruptant intégratif.

La construction de ce disruptant a comme point de départ le clonage d'un fragment de 470 pb amplifié par PCR et représentant la partie interne de l'ORF *babR*, dans le vecteur pSK oriT *kan*.

La procédure utilisée est la suivante. Un fragment interne du gène *babR* sera cloné dans un vecteur non réplcatif chez *Brucella*, après avoir été amplifié par PCR. La construction obtenue sera ensuite transférée par conjugaison chez *Brucella melitensis* 16M (figure 8).

2.1. Amplification par PCR de la partie interne de *babR*..

Les amorces nucléotidiques utilisées ont été définies sur base de la séquence du régulateur *babR* et nommées BT-babintern1 et BT-babintern2. Leur séquences sont reprises à la table 1. La partie amplifiée appartient au domaine N-terminal de BabR (domaine de liaison à l'HSL). Le plasmide pSK oriT *babR*, déjà évoqué au début de ce chapitre, a été employé comme ADN matrice pour cette PCR. La Pwo polymérase sera utilisée afin de générer un produit de PCR à bouts francs, (Les conditions utilisées pour la PCR sont les suivantes :

- Dénaturation de 5 min à 95°C
- 30 cycles d'amplification divisés en trois étapes :
 - 45 sec. à 95°C pour la dénaturation
 - 1 min. à 60°C pour l'hybridation

- 1 min. à 72°C pour la polymérisation.

- Elongation finale de 10 min. à 72°C.

Les produits PCR ont été purifiés avec le kit de purification pour produits PCR et puis analysés par électrophorèse en gel d'agarose 1%. Un produit PCR de la taille attendue (470bp) (figure 9) a été amplifié avec succès.

2.2. Clonage de *babintern* dans le pSK oriT *kan*.

Le pSK oriT *kan* a été construit par Valérie Haine au cours de son mémoire (juin 2000). Elle l'a obtenu en intégrant la cassette *kan* (amplifiée par PCR) au site unique *ScaI* présent dans le gène de résistance à l'ampicilline du pSK oriT^a..

Le fragment interne de *babR* et le pSK oriT *kan*, linéarisé par *EcoRV*, ont été mis ensemble dans un tampon de ligation en présence de la T4 DNA ligase. Vu qu'il s'agit d'un clonage à bouts francs, le pSK oriT *kan* a été déphosphorylé (pour éviter que le plasmide ne se referme sur lui-même) avec une phosphatase (la SAP). La réaction de ligation s'est déroulée à température ambiante pendant 4 heures. Le mix de ligation a ensuite été désalé pour éviter que les sels présents dans la solution ne viennent perturber l'électroporation.

Des cellules DH5 α électrocompétentes ont été transformées avec le mélange de ligation et puis étalées sur un milieu sélectif LB agar contenant de la kanamycine, de l'IPTG et de l'X-Gal. Le résultat de la transformation s'est avéré concluant, 8 colonies blanches ont été obtenues après une nuit d'incubation. Elles ont été repiquées sur un milieu LB agar Kan, Xgal, IPTG. Des miniprep ont finalement été réalisées à partir de cultures liquides de ces colonies. Une fois récupéré, l'ADN plasmidique des 8 clones a été restreint avec l'enzyme *HindIII*. L'analyse en gel d'agarose (figure 10) montre que 6 clones présentent le profil de restriction attendu, c'est à dire deux fragments d'environ 2 kb et 2,5 kb (figure 8). Les deux autres clones (clones 3 et 8) présentent un profil de restriction comparable à celui du plasmide pSK oriT *kan* vide, coupé par la même enzyme.

Afin de s'assurer que les 6 clones possédaient bien la bonne construction, une PCR a été réalisée en utilisant les amorces BT-babintern1 et BT-babintern2. Les conditions utilisées sont les suivantes :

- Dénaturation de 5 min à 95°C

^a Pourquoi avoir remplacé le gène de résistance à l'ampicilline par le gène de résistance à la kanamycine ? On sait que l'ampicilline se dégrade très rapidement à la chaleur or les *Brucella* sont cultivées dans une étuve à

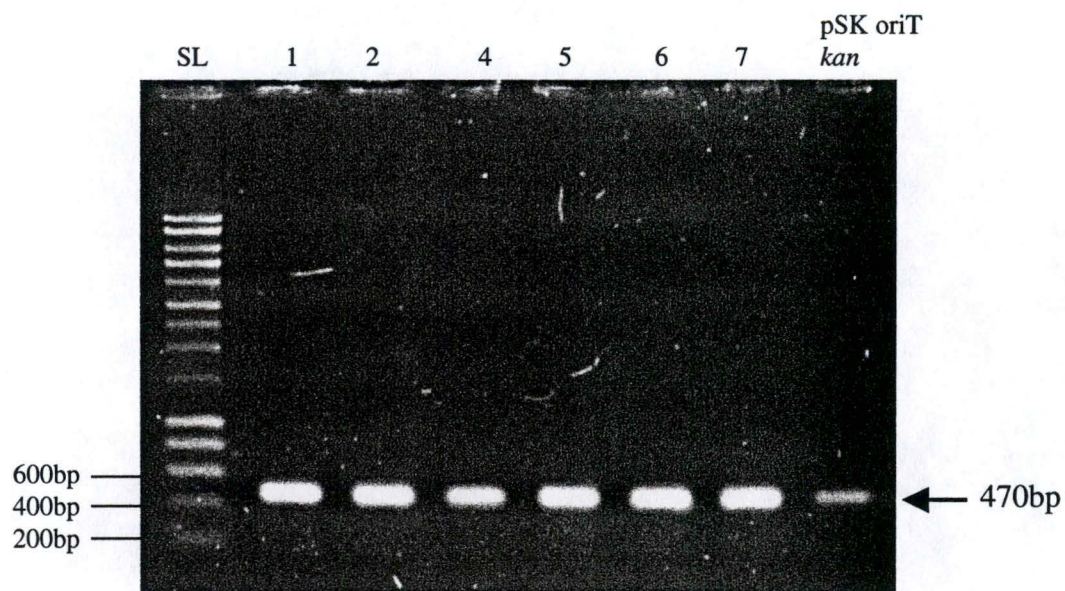


Figure 11 : Produits de PCR résultant de l'amplification de *babintern*, avec les amorces BT-babintern1 et 2, sur l'ADN pasmidique des clones recombinants (1,2,4-7) et sur le pSK oriT *kan* (contrôle négatif). SL : marqueur de poids moléculaire « Smart ladder » (Eurogentec).

- 30 cycles d'amplification divisés en trois étapes :
 - 45 sec. à 95°C pour la dénaturation
 - 1 min. à 60°C pour l'hybridation
 - 1 min. à 72°C pour la polymérisation.
- Elongation finale de 10 min. à 72°C.

Les produits de la PCR ont ensuite été vérifiés par électrophorèse en gel d'agarose. Comme le montre la figure 12, les fragments de taille attendue (470 pb) sont bien présents. Un contrôle négatif utilisant le pSK oriT *kan* a été effectué. La faible bande observée serait due à un débordement de puit car au cours d'une seconde PCR réalisée dans les mêmes conditions, aucune amplification de ce plasmide n'a pu être observée.

Le séquençage du fragment interne a été réalisé à partir du clone n°6 et initiée à l'aide de deux amorces (forward et reverse) spécifiques du plasmide pBluescript et dont les séquences sont reprises à la table 1. Ces amorces sont convergentes et viendront s'hybrider sur les régions plasmidiques bordant l'insert. La séquence obtenue a ensuite été comparée à la séquence de *babR* déjà en notre possession. Ceci a permis de déterminer l'orientation du fragment interne de *babR* par rapport au site multiple de clonage du pSK oriT *kan*.

2.3. Conjugaison : *E. coli* S17 → *B. melitensis* 16M.

Le nouveau plasmide pSK oriT *kan babintern* a d'abord été introduit par transformation dans des bactéries *E. coli* S17 λ pir électrocompétentes, puis transféré par conjugaison entre ces bactéries donneuses et la souche receveuse *B. melitensis* 16M. Le transfert conjugatif a été réalisé sur un filtre. Après une heure d'incubation à 37°C, les bactéries sont transférées sur un milieu de sélection 2YT agar Nal Kan. Ces antibiotiques permettent de sélectionner les *Brucella* ayant incorporé le plasmide. Six jours plus tard, deux colonies recombinantes ont été isolées sur milieu 2YT agar Nal Kan. Afin de s'assurer que ces clones résultent de l'intégration de pSK *kan babintern*, leur génotype va être déterminé.

37°C pendant plusieurs jours. La kanamycine, plus résistante, permet de maintenir une pression de sélection le temps que les *Brucella* poussent.

2.4. Vérification du génotype des 2 candidats obtenus par PCR et Southern blot.

Afin de s'assurer de l'intégration du plasmide pSK oriT *kan babintern* dans le génome des deux clones obtenus et plus particulièrement dans le gène encodant BabR, une PCR et un southern blot ont été réalisés.

Le profil attendu (figure 12) est composé de deux copies incomplètes du gène *babR*. Ces deux copies possèdent un fragment interne commun. La première copie est constituée de la région babR-amont tandis que la seconde copie est constituée de la région babR-aval.

A. PCR.

Des PCR ont été réalisées à partir de l'ADN génomique des deux candidats obtenus. Deux séries d'amorces ont été employées : Reverse (R) et babR-amont; Forward (F) et babR-aval. Elles nous permettront de savoir si les deux mutants possèdent le génotype attendu, à savoir deux copies incomplètes du gène *babR*. Les amorces F et R viennent s'hybrider sur les régions plasmidiques bordant le gène *babR* disrupté, les amorces babR-aval et babR-amont viennent s'hybrider sur l'ADN génomique bordant la copie sauvage de gène *babR*.

Les conditions utilisées au cours de cette PCR sont les suivantes :

Dans le cas des amorces forward et babRaval :

- Dénaturation de 5 min à 95°C
- 30 cycles d'amplification divisés en trois étapes :
 - 30 sec. à 95°C pour la dénaturation
 - 45 sec. à 50°C pour l'hybridation
 - 1 min. à 72°C pour la polymérisation.
- Elongation finale de 10 min. à 72°C.

Dans le cas des amorces reverse et babRamont :

- Dénaturation de 5 min à 95°C
- 30 cycles d'amplification divisés en trois étapes :
 - 30 sec. à 95°C pour la dénaturation
 - 45 sec. à 54°C pour l'hybridation
 - 1 min. à 72°C pour la polymérisation.
- Elongation finale de 10 min. à 72°C.

Les produits PCR ont ensuite été analysés par électrophorèse en gel d'agarose. Les produits PCR de tailles attendues (figure13) ont été amplifiés avec succès. La première PCR réalisée avec les amorces F et babR-aval nous a permis d'amplifier un produit d'une taille de

733 pb tandis que la deuxième PCR, réalisée avec les amorces R et babR-amont, nous a donné une bande de 666 pb.

D'après les résultats obtenus, on peut conclure que chez les deux candidats isolés, le plasmide s'est intégré dans *babR*. Cette intégration a bien générée les deux copies disruptées attendues.

B. Southern blot.

L'utilisation d'une sonde (*babintern*) qui viendra s'hybrider sur la partie interne du gène *babR* permettra de vérifier si deux copies incomplètes de ce gène, résultant de l'intégration du plasmide pSK oriT *kan babRintern*, sont bien présentes dans le génome de ces deux clones. Cette expérience sera aussi réalisée avec l'ADN génomique de *Brucella melitensis* 16M et de *Brucella abortus* 544, ne possédant qu'une seule copie intacte de *babR*.

La sonde *babintern* a été marquée avec des dUTP couplés à la digoxigenin. Le marquage de celle-ci a été vérifié. Pour ce faire différentes dilutions de la sonde ont été déposées sur un filtre de nitrocellulose, on a ensuite procédé à leur détection par chimiluminescence.

L'ADN génomique des deux mutants et des souches de *Brucella melitensis* 16M et de *Brucella abortus* 544 a été récupéré et restreint par *EcoRI*. Cette enzyme coupe une fois dans le pSK oriT *kan babintern* mais en dehors de *babR*. Les fragments de restriction ont été séparés par électrophorèse en gel d'agarose et transférés sur un filtre de nitrocellulose. Le filtre a ensuite été incubé dans un milieu favorisant l'hybridation, avec la sonde d'ADN représentant le fragment interne de *babR* amplifié par PCR. Cette sonde n'ira s'hybrider à sa région complémentaire que si celle-ci est présente dans le gel.

Etant donné que la séquence d'ADN génomique bordant *babR* est connue, les tailles des fragments contenant *babRintern*, résultant d'une restriction *EcoRI*, sont connues. Il s'agit de 3 kb dans le cas de *Brucella melitensis* 16M et de *Brucella abortus* 544 et de 600 et 6886 pb dans le cas des mutants. La détection révèle la présence, comme attendu, d'un seul fragment d'une taille d'environ 3 kilobases chez les souches sauvages de *Brucella*. La sonde est également venue s'hybrider en deux endroits de tailles attendues sur le profil de restriction du premier clone (600 et 6886bp) (figure 14). Cette analyse nous montre bien que l'intégration du plasmide contenant la copie disruptée du gène *babr*, pour le premier clone, s'est réalisée au bon endroit dans le génome. Un problème est survenu pour le clone 2. Il s'est avéré que la quantité de matériel déposé sur le gel n'était pas

suffisante pour permettre l'hybridation de la sonde. Cette partie de l'expérience devra donc être recommencée (en dehors du cadre de ce mémoire).

2.5. Infection de cellules HeLa.

La survie de nos deux mutants a été évaluée dans des cellules épithéloïdes humaines HeLa. Cette infection nous permettra de savoir si le gène disrupté est important pour la survie et la multiplication des *Brucella* chez les cellules eukaryotes. Pour des raisons de facilité, nous appellerons nos mutants I1 et I2.

Ces mutants, ainsi que la souche sauvage, ont été mis en présence de cellules HeLa (à raison de 300 bactéries par cellule). Ils ont ensuite été incubés à 37°C en présence de CO₂. Après une heure d'infection, les bactéries extracellulaires ont été tuées par addition de gentamycine (cet antibiotique ne peut pas pénétrer la membrane plasmique des eukaryotes). Seules les bactéries issues de l'infection d'une cellule HeLa seront donc dénombrées. Quarante-huit heures plus tard, les cellules HeLa ont été lysées et les *Brucella* intracellulaires comptées. Les résultats sont représentés à la figure 15. Une même quantité de cellules intracellulaires a été observée pour la souche sauvage et pour le mutant I1 (log de 7). Leur capacité d'infection semble donc identique. Par contre, la quantité de bactéries intracellulaires observée pour le mutant I2 est beaucoup moins importante. Ce mutant présente donc une atténuation de son pouvoir infectieux.

2.6. Discussion.

On constate que le mutant I1 se réplique aussi efficacement que la souche parentale sauvage alors que le mutant I2 est significativement atténué dans ce modèle cellulaire. Les mutants I1 et I2 ont donc des phénotypes différents : le mutant I2 contrairement au mutant I1 semble affecter dans sa capacité à se répliquer à l'intérieur des cellules HeLa.

Pour rappel, ces deux mutants ont été obtenus par intégration du même plasmide (pSK oriT *kan babintern*) et l'analyse de leur ADN génomique par PCR montre qu'ils ont le même profil. Les génotypes des bactéries récupérées du lysat de cellules HeLa infectées par les mutants ont été vérifiés par PCR dans les mêmes conditions que décrites plus haut. Ceux-ci correspondent bien à I1 et I2.

Il est possible que l'atténuation de I2 soit due à un autre événement. Par exemple, l'apparition d'une mutation ponctuelle dans un gène nécessaire à l'infection. Il se pourrait aussi

qu'un deuxième plasmide se soit intégré, de façon ectopique, dans le génome du mutant I2, touchant peut-être ainsi un gène intervenant dans la virulence...

Pour vérifier cette hypothèse, l'analyse de l'ADN génomique des mutants par Southern blot, en utilisant une sonde s'hybridant à la matrice plasmidique (par exemple sur le gène *kan*), va permettre de déterminer s'il y a une ou plusieurs copies du plasmide. De plus, pour montrer que le phénotype observé avec le mutant I2 est bien dû à la perte du gène *babR*, on pourrait essayer de le compléter par apport d'une copie plasmidique sauvage de *babR* et déterminer si la souche complémentée retrouve une capacité infectieuse comparable à celle de la souche sauvage.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.

Le but de ce mémoire était de créer un mutant du gène encodant le régulateur BabR. Dans cette optique, deux approches ont été envisagées et réalisées en parallèle : la création d'un délétant et celle d'un disruptant intégratif. Dans les deux cas, les constructions désirées ont été obtenues (pSK oriT babR::kan et pSK oriT kan babintern), et transférées par conjugaison chez *Brucella melitensis* 16M.

Pour l'essai de délétion, 14 clones résistants à la kanamycine ont été obtenus, aucun d'entre eux n'étaient sensibles à l'ampicilline. Ceci prouve donc que le plasmide s'est intégré dans le génome et a entraîné l'apparition d'intégrants plutôt que de délétants. Par manque de temps, cette approche n'a pas pu être réalisée une deuxième fois dans de meilleures conditions. Plusieurs points de la démarche suivie pourrait cependant être améliorés pour essayer d'optimiser nos chances d'obtenir ce délétant : le temps réel de conjugaison ainsi que le nombre de clones criblés pourrait être augmentés ; le rapport des quantités des différentes bactéries mises en présence ; l'utilisation d'un marqueur de contre-sélection afin de forcer la perte du plasmide, favorisant ainsi les doubles recombinaisons (Reyrat *et al.*, 1998)...

L'hypothèse alternative pour expliquer l'échec de l'obtention d'un délétant serait le caractère essentiel du gène *babR*. A ce stade, nous n'aurions qu'une évidence négative de cette essentialité, évidence rendue plus ténue encore au vu du peu de clones testés... En outre, l'obtention d'un disruptant viable (voir ci-dessous) nous permet d'affirmer que *babR* est non essentiel.

Dans le cas du disruptant intégratif, le transfert conjugatif de la construction obtenue, chez *Brucella melitensis* 16M, nous a donné deux clones candidats. Le génotype de ces deux clones a été vérifié grâce à deux techniques : la PCR et le Southern blot. On a pu montrer par PCR qu'ils étaient bien issus de l'intégration du plasmide pSK oriT kan babintern dans la copie chromosomique de *babR*. Par contre, le Southern blot n'a révélé la présence des deux copies du fragment interne que chez le premier mutant.

Nous avons ensuite testé la capacité de répllication de ces clones en cellules eucaryotes (cellules Hela) dans le but de savoir si la mutation affectant *babR* a des conséquences sur le pouvoir infectieux de *Brucella*. Les résultats obtenus sont quelque peu déconcertants. En effet, alors que le premier mutant ne présente aucune atténuation, le deuxième mutant semble

nettement affecté dans sa survie intracellulaire. Comment est-il possible que deux mutants présentant les mêmes profils génomiques soient apparemment si différents dans leur comportement ? Avant de pouvoir tirer des conclusions de cette expérience préliminaire, l'analyse du génotype des deux mutants sera effectuée, avec une nouvelle analyse en Southern blot de l'ADN génomique à l'aide d'une sonde babintern ou d'une sonde spécifique au plasmide. De plus, l'expérience d'infection expérimentale devra être renouvelée dans les modèles disponibles au laboratoire (Cellules HeLa et lignée de macrophage). On pourrait également attendre l'obtention du délétant avant de répéter l'expérience et d'en mettre au point les paramètres.

Grâce à la présence d'un mutant de *babR*, plusieurs stratégies peuvent être envisagée dans l'optique de recherche de rôles potentiels de ce régulateur.

Outre l'existence d'un homologue de LuxR, une HSL a été identifiée dans le surnageant de culture de *B. melitensis* 16M : C12-HSL. De plus, il a récemment été montré que l'addition de cette HSL dans le milieu d'une culture de *B. melitensis* en début de phase logarithmique, provoque une inhibition de la transcription de l'opéron *virB*. Cet opéron, découvert chez *B. suis*, encode un système de sécrétion de type IV est décrit comme étant nécessaire à la virulence de *Brucella* (O'Callaghan *et al.*, 1999). Différents mutants *virB* de *B. melitensis* 16M ont été isolés au laboratoire pour leur atténuation dans la survie intracellulaire (Rose-May Delrue, thèse en cours).

Il est évident que relier l'effet observé des HSLs sur le système *virB* au régulateur BabR est une idée séduisante. Il se peut que l'inhibition de la transcription de *virB* soit médiée par BabR, activé par C12-HSL. Dans ce cas, l'addition de cette phéromone à une culture en début de phase logarithmique du mutant *babR* ne devrait pas perturber la transcription des gènes *virB*. Si ce n'est pas le cas, cela pourrait être expliqué par le fait que BabR n'interagit pas avec cette phéromone là ou encore que le promoteur *virB* n'est pas une cible de BabR.

Une autre idée est de vérifier si le mutant *babR* produit toujours des HSLs. En effet, si les HSLs sont synthétisées par les homologues de LuxI, la transcription des gènes de synthétases sont souvent sous le contrôle positif du régulateur activé par l'HSL (auto-induction) (Fuqua and Eberhard, 1999). Sans l'induction transcriptionnelle de *babR*, il se peut que la synthétase produisant C12-HSL reste exprimée à un taux basal, ce qui entraînerait une diminution de la quantité d'HSL produites à haute densité cellulaire.

Cependant, des exemples où l'expression de la synthétase est indépendante de la présence d'HSL sont connus (Beck von Bodman and Farrand, 1995; Throup *et al.*, 1995). La bactérie n'a sans doute pas toujours avantage à disposer d'un système d'expansion rapide du signal (résultant d'un phénomène d'autoinduction). De plus, si la mutation de *babR* n'influence pas

la production de C12-HSL, c'est peut-être simplement du au fait que BabR et la synthétase de C12-HSL font partie de système de quorum sensing séparé ou hiérarchisé (dans ce cas, BabR serait assujetti au système auquel appartient la synthétase). Par exemple, deux systèmes de quorum sensing hiérarchisés existent chez *P. aeruginosa* (Brint and Ohman, 1995 ; Pesci *et al.*, 1999).

Enfin, les protéines dont l'expression est régulées par BabR pourraient être identifiées par comparaison du profil électrophorétique à deux dimensions de la souche sauvage et du mutant *babR*. Les protéines, dont la présence relative varie seraient identifiées par séquençage N-terminal. Cette approche allie une grande sensibilité et une capacité à voir l'effet global de l'absence de BabR qui la rend prometteuse. L'identification de cibles régulées par BabR ouvrira la porte à de multiples investigations afin de préciser les rouages d'une partie du mécanisme de quorum sensing chez *B. melitensis* 16M.

MATERIEL ET METHODES

1. Souches bactériennes et plasmides

1.1 Souches bactériennes

1.1.1 *E. coli* XL1-blue

Quelques particularités intéressantes de son génotype.

recA1: réduit la recombinaison au millième de son taux normal, minimisant ainsi la recombinaison entre ADN endogène et exogène.

endA1: améliore le rendement et la qualité des préparations d'ADN plasmidique à petite échelle en diminuant le taux d'endonucléases.

La souche XL1-blue délétée au niveau de l'opéron lactose (Δ lac), est incapable de métaboliser le lactose. L'épisome F' codant pour des pili sexuels présents en surface de la bactérie porte les caractères suivants:

Tn10: contient un marqueur de résistance à la tétracycline (Tet^R) permettant de sélectionner les bactéries contenant l'épisome F'.

proAB: signifie que la souche a besoin de proline dans son milieu de culture.

LacI^q est une mutation renforçant la production du represseur de l'opéron lactose.

Lac z Δ M15 est synonyme d'une délétion du gène de la β -galactosidase dans sa partie N-terminale, produisant une protéine inactive.

Le test blanc-bleu (figure 1)

Les éléments génétiques portés par la souche ne lui permettent pas d'avoir une activité β -galactosidase normale, une complémentation intragénique avec un plasmide apportant LacI(fragment non opérationel du gène de régulation de l'opéron lactose) et un fragment du gène *lacZ* (partie N-terminale de la β -galactosidase). Lorsque cette complémentation est effectuée la bactérie possède une β -galactosidase fonctionnelle. Celle-ci est mise en évidence par son action sur l'X-gal, substrat chromogène qui donne un composé bleu lorsqu'il est clivé. L'addition d'IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactoside) permet la dérepression de l'expression de *lacZ* (c'est en fait un inhibiteur de LacI). Le test blanc met en évidence les bactéries présentant un plasmide contenant un insert car celui-ci est disruptive le gène *lacZ'* et la β -galactosidase n'est plus fonctionnelle. La colonie bactérienne apparaîtra donc blanche.

1.1.2 *E. coli* DH5 α

La souche d'*E. coli* DH5 α possède les même caractéristiques intéressantes que *E. coli* XL1-Blue mais son taux de croissance est plus rapide.

1.1.3 *E. coli* S17- λ pir

La souche d'*E. coli* S17- λ pir est résistante à la streptomycine (Sm^R), à la spectinomycine (Sp^R) et au timéthoprim (Tp^R). Cette souche d'*E. coli*, utilisée pour les conjugaisons, possède notamment les caractéristiques intéressantes suivantes,

RP4⁺: l'intégration du plasmide RP4 dans le chromosome bactérien permet le transfert conjugatif d'un plasmide mobilisable (contenant une origine de transfert) de la bactérie S17 vers une bactérie receveuse.

1.1.4 *Brucella* sp.

Au niveau de la chaîne O du LPS de *Brucella* sp., des antigènes distincts sont présents à la surface des espèces *B. abortus* et *B. melitensis*. L'antigène de surface A est prédominant chez la souche *B. abortus* tandis que c'est l'antigène M qui est prédominant chez l'espèce *B. melitensis*.

B. melitensis biovar 1 souche 16M est une souche de phénotype "S", l'agglutination se produit avec un sérum anti-M. L'autre souche utilisée est *B. abortus* biovar 1 souche 544.

Ces souches utilisées sont des mutants spontanés résistants à l'acide nalidixique (Nal^R).

1.2 Plasmides bactériens (figure 2)

1.2.1. pBluescript

pBluescript (Stratagène) est un phagémide, c'est-à-dire un hybride entre un plasmide et un phage, de 2,964 kb. Il porte une origine de réplication pour *E. coli* mais qui n'est pas reconnue dans *Brucella* (colE1 ORI) et l'origine de réplication phagienne fl. Il porte aussi le gène *bla* encodant la résistance à l'ampicilline, afin de sélectionner des clones recombinants. C'est ce vecteur qui permet la complémentation intragénique de la souche de *E. coli* X11-blue. Ce gène possède une série de sites de restriction uniques (MCS) à l'extrémité N-terminale du gène LacZ'. Ces sites n'altèrent pas la complémentation mais si un fragment est cloné dans l'un d'entre eux, le gène LacZ' est disrupté et la complémentation est alors impossible.

1.2.2. pBluescript SK-oriT

Le plasmide pBluescript SK-oriT est dérivé du pBluescript sa taille est de 3,17Kb. L'origine de réplication phagienne fl a été remplacée par un fragment contenant l'origine de transfert (oriT) du plasmide RK2. La séquence oriT permet le transfert conjugatif du plasmide.

1.2.3. pUC4K

Ce plasmide de 3914 pb porte un gène encodant la résistance à la kanamycine (Kan^R). Le gène Kan^r est bordé de part et d'autre par 4 sites de restriction.

2. Milieux de culture

Les antibiotiques utilisés ainsi que la concentration à laquelle ils ont été employés se trouvent au Tableau 1.

Milieu Luria Bertani (LB)

- | | |
|------------------------------------|---------------|
| - Hydrolysate de caséine (peptone) | 1 g/100 ml. |
| - NaCl | 0,5 g/100 ml. |
| - Yeast extract | 0,5 g/100 ml. |

Le milieu est autoclavé (20 minutes à 120°C).

Milieu LB solide

De même composition que le LB liquide, ce milieu contient 2% d'Agar. Le milieu autoclavé est refroidi à 55°C, il est additionné d'antibiotiques ou autres additifs mentionnés et coulé dans des boîtes de Pétri.

Milieu 2YT

Ce milieu a la même composition de base que le LB mais la concentration en Yeast extract est 2 fois plus élevée.

- | | |
|---|--|
| -NaCl | 0,5g/100ml |
| -Yeast Extract | 1g/100ml |
| -Hydrolysate de caséine (peptone Gibco BRL) | 1g/100ml |
| solide | -(Agar 2g/100ml) si l'on désire du 2YT |

Le milieu est autoclavé 20 minutes à 120°C

Milieu RPMI 1640

- milieu riche pour culture de cellules eucaryotes commercialisé par GIBCO-BRL

3. Conjugaison (figure 3)

La conjugaison bactérienne entre bactéries Gram négatives est un transfert latéral de matériel génétique. La bactérie donneuse transfère un plasmide conjugal vers la bactérie receveuse. La conjugaison se fait grâce à un contact entre bactéries. La souche donneuse possède le plasmide RP4 intégré dans son chromosome. Ce plasmide mobilisable possède les gènes encodant pour les protéines nécessaires au transfert conjugal.

- Prélèver des colonies de *B. melitensis* 16M et resuspendre dans 150µl de NaCl 0,9%.
- Etaler ces 150µl sur une boîte de Petri contenant du milieu 2YT Nal trois à quatre jours avant la conjugaison.

- La veille de la conjugaison, ajouter sur la boîte de Pétri 3ml de NaCl 0,9% et racler les colonies. Prélever 1ml de la suspension bactérienne et la diluer 10X dans du NaCl 0,9%. Prendre 1ml pour ensemencer 9ml de 2YT Liquide contenant de l'acide nalidixique.
- Ensemencer 10ml de LB liquide avec les souche d'*E. coli* S17.
- Avant la conjugaison, laver les bactéries pour éliminer les antibiotique du milieu de culture en centrifugeant 15 minutes à 2500 rpm et resuspendre le culot bactérien dans 1/10 du volume de la culture de départ..
- Placer un filtre stérile 0,22µm de 82 mm de diamètre sur une boîte de pétri contenant du 2YT, y déposer 100 µl de culture de *B. melitensis* et 100 µl d'*E.coli* S17 lavées et resuspendues.
- Mélanger et étaler les gouttes de bactéries sur la totalité du filtre.
- Laisser incuber au moins 1 heure à 37°C.
- Récupérer les bactéries sur le filtre dans 1 ml de milieu.
- Etaler la totalité sur un milieu 2YT sélectif.
- Incuber 3-4 jours à 37°C.

4. Techniques d'ADN recombinant

4.1. Minipréparation d'ADN plasmidique d'*E.coli*

Une miniprep comprend 5 étapes: la lyse alcaline des bactéries, l'élimination des protéines et des débris cellulaires, la précipitation de l'ADN plasmidique, le lavage de l'ADN plasmidique et enfin sa resuspension.

- Ensemencer 5 ml de milieu liquide (LB+antibiotiques) avec une colonie isolée.
- Incuber la culture liquide une nuit à 37°C sous forte agitation.
- Centrifuger 1.5 ml de la culture dans un eppendorf (pendant 5 minutes à 12 500 rpm) et éliminer le milieu de culture.
- Resuspendre ce culot dans 300 µl de P1(avec RNase A)
- Ajouter 300 µl de P2 et mélanger doucement, incuber 5 minutes à température ambiante.
- Ajouter 300 µl de P3 et mélanger doucement, incuber 10 minutes sur glace.
- Centrifuger 15 minutes à 12500 rpm et récupérer le surnageant.
- Précipiter l'ADN en ajoutant 0.7 volume d'isopropanol, homogénéiser.
- Centrifuger 15 minutes à température ambiante (à 12500 rpm) , éliminer le surnageant.
- Laver l'ADN, c'est-à-dire ajouter 300 µl d'éthanol 70% et centrifuger 5 minutes à 12500 rpm à 4°C. Eliminer prudemment l'éthanol.
- Sécher sous vide quelques minutes.
- Resuspendre dans 20 à 50 µl d'H₂O distillée stérile (suivant le nombre de copies du plasmide récupéré).

Solutions et tampons:

- Tampon P1 (stocké à 4°C):

RNase A	100 µg/ml
Tris-HCl	50 mM, pH 8.0
EDTA	10 mM

- Tampon P2:

NaOH	200 mM
SDS	1% (stocké à température ambiante)
- Tampon P3: KAc 3.0 M pH 5.5 (stocké à 4°C)

4.2. Restriction de l'ADN

Le clivage de l'ADN bicaténaire à des sites précis se fait par des endonucléases de restriction qui reconnaissent de courtes séquences d'ADN. En pratique, la réaction se fait par incubation de l'ADN avec une ou des enzymes de restriction commerciale.

Mélange de restriction:

- x ngd'ADN à restreindre en suspension dans de l'eau distillée.
- Tampon de restriction 10 x : 1/10 du volume final (tampon commercial fourni avec l'enzyme). Enzyme de restriction: au maximum 1/10 du volume final. Entre 2 et 10 unités d'enzyme par µg d'ADN (en fonction de la pureté de l'ADN et de l'efficacité de l'enzyme).
- Eau distillée stérile pour atteindre le volume final.
- Incubation d'1 h30 à la température optimale pour l'enzyme (souvent 37°C).
- Analyse par électrophorèse en gel d'agarose.
- La réaction peut aussi être stoppée (enzyme inactivée) soit par chauffage (15 à 20 minutes à 65°C) si l'enzyme est thermosensible, soit par une extraction en phénol/chloroforme.

4.3. Electrophorèse en gel d'agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose sépare les fragments d'ADN en fonction de leurs tailles. Le pourcentage d'agarose à utiliser sera donc inversement proportionnel aux tailles des fragments à séparer. Le pourcentage habituel est de 0,8%.

La taille des fragments est estimée en faisant co-migrer des fragments d'ADN de taille connue. Nous avons utilisé comme marqueurs de taille: le SmartLadder de (Eurogentec) , le marqueur III (Roche) et le 100pb (MBI Fermentas) (fig. 4)

Les fragments sont visualisés grâce à du bromure d'éthidium (Fig. 5). Celui-ci se lie à l'ADN bicaténaire en s'intercalant entre les bases de la double hélice. Etant fluorescente, la molécule marque l'ADN et celui-ci est donc visible sous illumination UV. Il faut cependant noter que la fluorescence d'un fragment d'ADN est proportionnelle à sa taille, mais aussi à la quantité d'ADN présente. Ainsi, en connaissant la quantité d'ADN des marqueurs de taille, on peut estimer la quantité d'ADN du fragment par comparaison de l'intensité de la fluorescence.

Méthode:

- Porter à ébullition un volume approprié de tampon TAE additionner d'agarose, jusqu'à obtention d'une solution limpide.
- Quand la solution est refroidie (aux environs de 50°), ajouter 2 µl de BrEth (2 mg/ml). Couler l'agarose sur le support *ad hoc* muni d'un peigne.
- Après solidification immerger le gel dans une cuve d'électrophorèse contenant du TAE, auquel on a ajouté quelques µl d'une solution de bromure d'éthidium.
- Déposer les échantillons dans les puits et effectuer la migration au voltage désiré.

- Visualiser l'ADN du gel sous UV (transilluminateur longueur d'onde à 302 nm).

Solutions, tampons et fournitures:

- Solution d'alourdisseur:

Glycérol	50%
EDTA	100 mM
SDS	1%
Bleu de bromophénol	0.1%

- Tampon TAE (50 fois concentré)

Tris-HCl, pH 8.0	40 mM
EDTA	0.002 M
Acide acétique glacial	57.1 ml

4.4 Extraction d'ADN d'un gel d'agarose.

Cette technique permet de récupérer un fragment d'ADN d'un gel d'agarose isolé au cours de l'électrophorèse. Le kit utilisé est le QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen).

- Exciser le fragment d'intérêt du gel à l'aide d'un scalpel. Mettre le morceau d'agar dans un eppendorf. Peser le morceau d'agar.
- Ajouter trois volumes de tampon QG par 100 mg de gel.
- Incuber à 50°C pendant 10 min en agitant toutes les deux minutes.
- Ajouter un volume d'isopropanol et mélanger. Vérifier le pH après l'addition de l'isopropanol. L'adsorption de l'ADN dans la membrane QIAquick est efficace à pH<7,5. Si le pH est plus élevé, ajouter 10 µl d'acétate de sodium 3M, pH 5, mélanger et revérifier le pH.
- Verser le contenu dans une colonne "QIAquick spin", préalablement placée dans un tube collecteur.
- Centrifuger 1 min.
- Eliminer le liquide passé au travers de la colonne et remplacer la colonne de nouveau dans le tube collecteur.
- Ajouter 750 µl de tampon PE de lavage contenant de l'éthanol dans la colonne. Laisser agir 5 min. Centrifuger 1 min et éliminer le liquide passé au travers de la colonne.
- Centrifuger à nouveau 1 min de manière à éliminer toute trace d'éthanol.
- Placer la colonne dans un eppendorf. Eluer l'ADN avec 50 µl d'eau pure, placée bien au centre de la colonne et laisser agir une minute. Centrifuger 1 min pour récolter l'éluat.
- Conserver à -20°C

4.5. Réaction de déphosphorylation.

Lors d'une ligation bout franc ou d'une ligation bouts collants où les deux extrémités de la matrice sont compatibles, il faut déphosphoryler les extrémités de la matrice pour éviter qu'elle se relie sur elle-même (self-ligation). Sans groupement phosphate, la matrice peut encore se lier à l'insert qui lui n'a pas été déphosphorylé

Réactifs.

- Phosphatase :- Alkaline phosphatase, shrimp (Roche)
- Tampon de réaction (10X):
- 0,5 mM Tris-HCl pH8.5
- 50mM Mg₂Cl,

Protocole

- Incuber dans le tampon de réaction jusqu'à 0,2 pMol d'ADN bout franc avec une unité de phosphatase à 37° durant 1 heure.

4.6. Réaction de ligation

Pour lier de manière covalente deux fragments d'ADN d'un gel d'agarose, on utilise l'enzyme ADN ligase du phage T4. Elle catalyse la formation de liens phosphodiester entre l'hydroxyle 3' d'une extrémité d'ADN et le phosphate 5' d'une extrémité proche. L'enzyme pour être active nécessite la présence d'ATP et d'ions Mg^{++} .

Méthode:

- Dans un eppendorf, placer un mélange des deux fragments à liquer(de 1 à 100ng le plus souvent).
- Ajouter 1 µl d'ADN ligase T4.
- Ajouter 1/10 du volume total de tampon de ligation (10x, commercial).
- Compléter avec de l'eau distillée stérile.
- Incuber à 14-16°C pendant 10 à 14 heures si les extrémités sont protrudantes, ou quelques heures à environ 25° si les extrémités sont à bouts francs.
- La ligase est inactivée 15' à 78°C.
- Conserver le mélange de ligation à -20°C.

Témoins à utiliser:

- Un vecteur restreint dont le mélange de ligation ne contient pas de ligase: les molécules de ce vecteur restent linéaires et sont par là-même incapables de transformer efficacement les *E. coli* compétentes. Les colonies apparues sur milieu sélectif après transformation s'expliquent par la présence de vecteurs non-restreints; ce témoin permet d'évaluer la proportion des transformants due aux vecteurs non restreints.

- Un vecteur restreint soumis à l'action de la ligase, il permet de vérifier l'efficacité de la ligase.

Réaction de déssalage

Lors de l'électroporation de cellules bactériennes, la concentration en sels est cruciale. Il faut donc diminuer la quantité de sel apportée dans le mélange de ligation pour l'électroporation.

- Amener le mélange de ligation à 50µl avec de l'eau miliQ.
- Ajouter 400 µl de butanol non saturé en eau.
- Mélanger et centrifuger 10 minutes.
- éliminer le liquide en aspirant.
- sécher et resuspendre dans 5µl d'eau miliQ

5. Transformation bactérienne

La transformation de bactéries compétentes consiste à faire entrer de l'ADN exogène (plasmide) dans le microorganisme (figure 6). A cette fin, la paroi et la membrane bactérienne doivent être perméables à l'ADN: la bactérie est alors dite compétente.

Des bactéries gram-négatives *E. coli* en début de phase exponentielle de croissance sont rendues artificiellement compétentes par passage dans une solution hypotonique de chlorure de calcium. Celui-ci déstabilise la paroi de la bactérie, qui gonfle alors en prenant l'aspect d'un sphéroplaste. L'ADN plasmidique ajouté forme avec le calcium un complexe résistant aux désoxyribonucléases. Ce complexe est supposé adhérer à la bactérie. Les bactéries sont soumises à un choc thermique qui permet au complexe de rentrer dans la cellule.

Un temps d'incubation en milieu riche non sélectif permet aux bactéries de régénérer une paroi normale et aux gènes de résistance introduits de s'exprimer. Les transformants sont isolés par culture sur milieu sélectif contenant l'antibiotique dont le gène de résistance est apporté par le plasmide.

Méthode:

1. Préparation de cellules *E. coli* compétentes

- Culture de la souche d'*E. coli* à 37°C sur milieu solide LB+ antibiotiques.
- A partir d'une de ces colonies, ensemercer 10 ml de LB+ antibiotique. Agiter fortement la préculture à 37°C pendant la nuit.
- A partir de cette préculture ensemercer 100 ml de LB+ antibiotique. Incuber à 37°C sous agitation jusqu'à une absorbance d'environ 0.3 à 550 nm (début de phase de croissance exponentielle).
- Arrêter la croissance dans la glace pendant 10 minutes.
- Centrifuger la culture 15 minutes à 3000 rpm à 4°C (JOUAN). Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 1/2 volume de CaCl₂ 50 mM. Répéter cette étape une seconde fois.
- Laisser la solution 20 minutes sur glace puis centrifuger 15 minutes à 3000 rpm (JOUAN) à 4°C.
- Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans un volume de solution froide de CaCl₂ 50 mM glycérol 15% équivalent au dixième du volume initial.
- Aliquoter la suspension en eppendorfs et stocker à -80°C.

2. Transformation des cellules compétentes

- A 100µl de cellules compétentes, ajouter 10 µl de mélange de ligation ou <1 à 10 ng d'ADN.
- Déposer 30 minutes sur glace.
- Choc thermique de 2 minutes à 37°C ou 42°C.
- Ajouter 500 µl de LB liquide (sans antibiotique).
- Incuber 30 min. à 1 heure à 37°C.
- Etaler la suspension bactérienne sur milieu sélectif et incuber une nuit à 37°C.

Témoins de transformation:

- Transformer des bactéries avec un vecteur non-restreint afin de vérifier la compétence des cellules.
- Cellules compétentes subissant les conditions de transformation mais sans ADN, étalées sur un milieu riche non sélectif comme contrôle de viabilité des cellules

compétentes et sur un milieu sélectif pour tester la validité de ce milieu et évaluer la proportion de mutants spontanés résistants à l'antibiotique.

6. Electroporation bactérienne

L'électroporation est une méthode de transformation de bactéries, où le taux de survie et le taux de transformation bactérienne dépendent de l'intensité et de la durée du choc électrique.

Méthode

1. Préparation des cellules électrocompétentes

- Inoculer 1 L de LB liquide sélectif avec 1/100 du volume d'une culture fraîche de bactéries *E. coli*.XL1-blue
- Incuber les bactéries à 37°C sous forte agitation jusqu'à une D.O. de 0,5 à 0,8 à 550 nm (phase mi-log de croissance).
- Placer la culture 15 à 30 minutes dans la glace, centrifuger à 4°C à 3000 rpm pendant 15 minutes (JOUAN).
- Eliminer le surnageant. Resuspendre le culot dans 1 L d'eau distillée stérile (d.s.) froide. Centrifuger comme précédemment.
- Resuspendre dans 0,5 L d'eau d.s. froide et centrifuger.
- Resuspendre dans 20 ml d'eau d.s. froide contenant 10% de glycérol. Centrifuger.
- Resuspendre dans un volume final de 2 à 3 ml d'eau d.s. froide contenant 10% de glycérol. La concentration cellulaire est d'environ 1 à 3.10^{10} cellules/ml.
- Cette suspension peut être aliquotée sur glace et conservée à -80°C (pendant environ 6 mois).

2. Electroporation

- Laisser dégeler les cellules électrocompétentes sur glace.
- Placer dans un eppendorf stérile et froid (sur glace), 1 µl d'ADN plasmidique et au maximum 3µl d'un mélange de ligation et y ajouter 100µl de cellules compétentes.
- Mélanger et placer la solution 1 minute sur glace.
- Transférer dans la cuvette d'électroporation (0,2 cm) (se trouvant dans la glace) le contenu de l'eppendorf.
- Placer la cuvette dans l'électroporateur (BIO RAD Gene PulserTM).
- Régler l'appareil sur:
capacitance 25 µF
résistance 200 Ohms
différence de potentiel 22,5 Kv/cm
- Faire le choc électrique.
- Ajouter rapidement 1 ml de SOC.
- Transférer dans un eppendorf et laisser 1 heure à 37°C.
- Etaler sur milieu sélectif (100 à 250 µl/boîte) et incuber une nuit à 37°C.

Solution:

SOC:

Yeast extract	0,5%
Tryptone	2%
NaCl	10 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM

7. Amplification d'ADN par PCR

La PCR permet l'amplification de fragments d'ADN (figure 7). L'ADN doit être dénaturé. Des amorces oligonucléotidiques d'environ 20 bases complémentaires des séquences se trouvant de chaque côté de la région-cible, s'hybrident l'une au brin "sens" l'autre au brin "anti-sens". La longueur de la séquence-cible est déterminée par la distance entre les 2 amorces.

Une ADN polymérase thermostable, Taq (Bitools), Pwo (Roche) ou Expand (mélange des deux précédentes) (Roche) est alors utilisée pour synthétiser à partir de l'extrémité 3'-OH de chaque amorce un brin d'ADN. Un cycle consiste en 3 étapes: dénaturation, hybridation des amorces et élongation. En répétant ce cycle, on augmente de façon exponentielle le nombre de copies de la cible.

La température d'hybridation utilisée est inférieure à la température de melting T_m des amorces. Ce T_m se calcule de la façon suivante: $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$. De plus, les amorces devront contenir environ le même pourcentage de bases G-C que l'ADN cible. Il est également recommandé, de façon à limiter l'amplification non spécifique, que l'amorce contienne un excès de G/C à l'extrémité 5' et au centre et que les 2 ou 3 dernières bases de l'extrémité soient A/T.

Méthode

- Mélange de réaction réalisé dans un microtube:
- 10 µg de tampon d'ADN polymérase (Biotools) 10X
- 2 µl de dNTP 10 mM
- 1 µl de primer 1 100 pmole/µl
- 1 µl de primer 2 100 pmole/µl
- 1 µl d'enzyme (2 U/µl)
- Porter à 100 µl avec de l'eau distillée stérile
- Programmer l'appareil à PCR comme suit:
- Dénaturation de 5' à 95°C.
- 36 cycles d'amplification présentés comme suit:
 - 1 min. à 95°C pour la dénaturation
 - 1 min. à X°C pour l'hybridation (X est inférieur ou égale à la température d'hybridation des oligonucléotides)
 - X sec. à 72°C pour la polymérisation (68°C pour l'Expand) (X=1minute par kb à amplifier)
- Elongation finale de 10 minutes à 72°C.
- Déposer 10 µl sur gel d'agarose et conserver le reste à -20°C.

7.1. Purification de produits PCR.

Nous utilisons le kit "High pure PCR Product Purification kit" (Roche Molecular Biochemicals). Le principe est le suivant: l'acide nucléique se lie spécifiquement à la surface de fibres ou silices en présence de sels. La liaison de l'ADN étant totalement spécifique, il est facile de laver l'ADN de toutes les impuretés, comme les sels, nucléotides libres ou enzymes, et ce en une seule étape.

Méthode

- Porter le volume du produit PCR à 100 µl et y ajouter 500 µl de tampon de liaison (Binding buffer). Mélanger.

Composition du Binding buffer:

-guanidine-thiocyanate	3M
-Tris-HCl	10mM
-éthanol	5%
pH6,60	

- Verser le contenu du mélange dans une colonne, contenant le filtre. La colonne est préalablement mise dans un tube collecteur.
- Centrifuger 30 sec à 13000 rpm
- Eliminer le liquide passé au travers de la colonne.
- Appliquer 500 µl du tampon de lavage sur la colonne (Wash buffer).

Composition du Wash buffer

-NaCl	20mM
-Tris-HCl	2mM, pH7,5

Ajouter 40ml d'éthanol à 200ml du tampon avant utilisation.

- Centrifuger 30 sec à 13000 rpm.
- Eliminer le liquide passé au travers de la colonne.
- Recommencer l'opération avec 200 µl de Wash buffer.
- Insérer la colonne dans un Eppendorf propre.
- Eluer avec 100 µl d'eau pure.
- Pour vérifier la purification, mettre 1/10 du produit de purification sur gel d'agarose.
- Conserver à -20°C

8. Séquençage de l'ADN

Pour séquencer des fragments d'ADN nous avons utilisé le Kit ABI PRISM dye terminator (Perkin Elmer). Le principe appliqué dans ce kit est une Amplification d'ADN par PCR avec assimilation de didéoxyribonucléotides marqués à la fluorescéine. chacun de ces nucléotides possède son marquage propre (sa longueur d'onde d'émission), ce qui rend possible la lecture à partir d'une seule réaction PCR. Ce type de réaction permet par la suite l'utilisation d'un séquenceur automatique.

La réaction de PCR de séquençage est basée sur le principe de Sanger (figure8) (1977). L'incorporation des didéoxyribonucléotide arrête la réaction de polymérisation ce qui permet d'obtenir une population de brins tronqués qui représente la séquence d'ADN

- Une réaction de PCR est réalisée sur le fragment d'ADN .

* La concentration de l'ADN matrice doit être de 0.1 µg/µl si c'est un fragment monocaténaire, 0.2µg/µl si il est bicaténaire et 10 à 30 ng/µl de produit PCR. Si on se sert d'un produit PCR, une purification préalable est nécessaire, elle permet d'éliminer les amorces et les nucléotides qui interagiraient avec la réaction de séquençage

*La quantité d'amorce doit être de 3.2 pmôles

*8µl de terminator ready reaction mix sont ajoutés ensuite. Cette solution contient les 4 didésoxynucléotides marqués à la fluorescéine, du Tris-Hcl (pH 9), du MgCl₂, une pyrophosphatase stable, l'ampliTaQ ADN polymérase FS, dITP, dATP, dTTP, dCTP. Le dITP remplace le dGTP se qui évite la compression des bandes lors de l'électrophorèse L'ampliTaQ ADN polymérase FS remplace la Taq polymérase classique car elle est plus efficace pour l'incorporation de nucléotides marqués.

- Les temps de réaction préalablement réglés sur l'appareil PCR sont ceux appliqués en générale.

- Après la réaction de PCR, il est nécessaire de purifier l'ADN car de nombreux nucléotides marqués n'ont pas été incorporés dans la réaction de polymérisation. Leur présence pourrait perturber l'électrophorèse dans le séquenceur. Pour cette purification nous avons suivi le protocole suivant

* Ajouter 2µl de NaAc 3M pH4.8

- * Ajouter 50µl d' EtOH 95%
- * Mettre 10 ' sur glace
- * Centrifuger 20' dans une minifuge à vitesse maximale
- * Eliminer le surnageant
- * Ajouter 250µl d'EtOH 70% à 4°C
- * Centrifuger pendant 20 minutes
- * Eliminer l'EtOH, laisser sécher à l'air
- Les produits PCR sont séparés suivant leurs tailles par électrophorèses en gel de polyacrylamide en présence d'urée. Le résultat du gel sera détecté par un système optique relié à un ordinateur (ABI PRISM 377).

9. Analyse de l'ADN génomique de *Brucella sp.* par Southern blot

9.1. Extraction de l'ADN génomique de *Brucella sp.*

- Repiquer la souche de *Brucella sp.* sur une pente TSAYE+antibiotiques et incubé 24 h à 37°C.
- En utilisant une pipette pasteur boutonnée et repliée, prélever des bactéries et les resuspendre dans 567 µl de TENa (en eppendorf).
- Ajouter 30 µl de SDS 10% et 3 µl de protéinase K à 20 mg/ml.
- Homogénéiser en inversant doucement l'eppendorf et incubé à 37°C pendant 1 heure.
- Ajouter 600 µl de phénol saturé en tampon TENa, et agiter fortement l'eppendorf.
- Centrifuger 20 minutes à 4°C à 13500 rpm en minifuge.
- Récupérer la phase aqueuse supérieure sans emporter le voile à l'interface.
- Ajouter 80 µl de NaClO₄ 5M et 600 µl de chloroforme, agiter fortement.
- Centrifuger à 4°C pendant 10 minutes à 5000 rpm. Répéter cette extraction si un nodule blanc est visible à l'interface.
- Récupérer la phase aqueuse et ajouter 1 ml d'éthanol 100% (à -20°C).
- Mélanger en inversant l'eppendorf. L'adn génomique forme un amas visible.
- Centrifuger à 4°C pendant 10 minutes à 13500 rpm.
- Eliminer le surnageant et ajouter 1 ml d'éthanol 70% (à -20°C).
- Centrifuger 5 minutes à 13500 rpm et éliminer le surnageant.
- Sécher sous vide et ajouter dans 100 µl d'eau distillée stérile.
- Pour faciliter la resuspension, incubé l'eppendorf à 37°C pendant quelques heures.

Solutions et tampons

- TENa:

Tris	50 mM à pH 8
EDTA	50 mM
NaCl	0.1 M
- Protéinase K 20 mg/ml dans du tampon:

Tris pH	7.5 1mM
CaCl ₂	1mM
- conservé à 4°C.
- Phénol saturé en TENa

9.2. Southern blot

9.2.1. Marquage de la sonde et vérification

Le fragment d'ADN utilisé comme sonde est dénaturé et mis en présence d'hexanucléotides aléatoires. Une synthèse d'ADN est initiée par la polymérase Klenow, en incorporant des nucléotides dont un est lié à DIG (digoxigénine) (figure 9)

La sonde est réalisée en utilisant la Dig high Prime labeling reaction (Boehringer).

- Environ 1 µg d'ADN est porté à un volume final de 16 µl avec de l'eau stérile.
- Faire bouillir pendant 10 min. et ensuite conserver sur glace.
- Ajouter 4 µl du mélange DIG High Prime, mélanger et centrifuger brièvement.
- Incuber de 1 à 20 heures à 37 °C.
- Stopper la réaction par addition de 2 µl EDTA 0,2 M pH 8 et/ou en chauffant 10 min. à 65°C.

9.2.2. Electrophorèse en gel d'agarose

La séparation des fragments d'ADN restreint s'est faite dans un gel d'agarose de 0,8 %. Un marqueur de taille marqué avec la molécule DIG (Boehringer) a été utilisé (marqueur III).

9.2.3. Transfert et immobilisation

Après avoir séparé les fragments d'ADN sur gel d'agarose, on transfère les acides nucléiques sur une membrane de nylon.

Méthode

- Après l'électrophorèse, placer le gel d'agarose sous UV (302 nm) pendant 3 à 5 minutes. Les UV clivent l'ADN et facilitent ainsi le transfert.
- Immerger le gel dans la solution de dénaturation pendant 5 minutes.
- Immerger le gel dans la solution de neutralisation pendant 2x15 minutes.
- Découper un morceau de membrane de nylon TROPION-Plus chargée positivement (TROPION) de taille un peu supérieure à celle du gel et un morceau de papier Whatman.
- Par un système de transfert sous vide, l'ADN est transféré sur la membrane en présence de SSC 10X pendant 1 heure. Suivre le schéma ci-contre utilisant le système de transfert Hybrid vacuum blotter (figure 10).
- Après le transfert, sécher la membrane entre deux feuilles de papier Whatman 3 MM.
- Immobiliser l'ADN sur la membrane, en l'exposant aux UV pendant 5 secondes.

9.2.4. Hybridation

Après avoir fixé l'ADN transféré sur la membrane et marqué la sonde, il faut hybrider la sonde aux fragments d'ADN de la membrane. Le protocole qui a été utilisé est le suivant:

- Préhybrider la membrane pendant 30 min. à 65°C. dans la solution DIG Easy Hyb (Boehringer).
- Dénaturer la sonde en la plaçant dans de l'eau bouillante pendant 5 minutes.
- Centrifuger et la placer dans de la glace.
- Ajouter la sonde à la solution de préhybridation de l'hybratube et mélanger en inversant l'hybratube.
- Incuber à 68°C pendant une nuit.

9.2.5. Détection et révélation

La détection comprend une étape de saturation, une incubation avec l'anticorps anti-DIG couplé à la phosphatase alcaline et une réaction finale de chémoluminescence. Le CSDP-Ready-to-use (Boehringer) est transformé en un produit responsable de l'émission locale de lumière qui peut impressionner un film RX.

Méthode

- Récupérer la solution de préhybridation contenant la sonde et la stocker à -20°C .
- Laver la membrane à température ambiante, 2x 5 min. dans une solution SSC 2X, SDS 0,1%.
- Incuber la membrane à 65°C , 2x 15 min. dans une solution SSC 0,1X, SDS 0,1%
- Rincer la membrane dans la solution de lavage, pendant 1 à 5 minutes
- Saturer la membrane dans la solution de Blocking (Boehringer) pendant 30 min.
- Incuber pendant au moins 30min., avec l'anticorps anti-DIG-PA, dilué 1: 10 000 dans la solution de Blocking
- Laver la membrane 2x25 min. dans la solution de lavage.
- Equilibrer, en immergeant la membrane de 2 à 5 min. dans le detection-buffer (Boehringer).
- Placer la membrane dans un sac en plastique et ajouter la solution de CSPD-ready-to-use.
- Exposer la membrane à un film d'autoradiographie (toujours sous plastic) pendant 30sec. à 5 min. (ou plus). Pour accentuer la le signal, incuber à 37°C .
- Immerger le film pendant 1 min. dans le révélateur.
- Rincer le flm à l'eau et l'immerger pendant 1 min. dans le fixateur, le rincer.

Solutions

Solution de lavage:

Acide maléique	0,1M
NaCl	0,15M
Ajuster à pH 7,5 avec du NaOH solide.	
Ajouter, 0,3% de Tween 20	

10. Etude de la virulence : modèle cellulaire

Les cellules eucaryotes HeLa sont cultivées dans un milieu RPMI 1640 additionné de Foetal Calf Serum (FCS)10% contenant des facteurs de croissance. La culture est réalisée à 37°C + 5% de CO_2 dans des flasques F75 (NUNC) .

10.1. Croissance et infection de cellules HeLa en plaques multipuits

Jour -1:

*Pour les cellules eucaryotes:

- Eliminer le milieu RPMI+FCS10%
- Détacher le tapis cellulaire en ajoutant 7ml de trypsine diluée Xfois dans du PBS stéril. Laisser agir 5 à 10 minutes à 37°C .
- Stopper la réaction en ajoutant du milieu additionné de FCS.
- Centrifuger à 1000 rpm pendant 10 minutes.
- Eliminer le surnageant et resuspendre le culot cellulaire dans 1ml de RPMI+FCS10%.
- Effectuer un comptage du nombre de cellules grâce à une cellule de Thomas.
- Diluer la suspension cellulaire de façon à obtenir 2.10^4 bactéries /100 μl

-100µl de cette dilution soit 2×10^4 cellules, sont déposés dans chacun des puits d'une plaque multipuits (Nucleon).

*Pour les bactéries:

-Ensemencer 10ml de RPMI 1640 avec les souches de *Brucella* à tester

Jour 0:

-Déterminer le nombre de bactéries par une prise de les DO_{590} ($DO_{590} 1 = 3 \times 10^9$ bactéries/ml).

-Amener à une dose infectante (DI) de 300 bactéries par cellule eucaryote, soit 3×10^7 bactérie/ml dilué dans du milieu RPMI+FCS10%.

-100 µl de cette dilution bactérienne servira à infecter les cellules eucaryotes contenues dans un puit.

-Centrifuger 10 minutes à 1000rpm afin d'augmenter les contacts entre les bactéries et les cellules eucaryotes.

-Incuber 1 heure à 37°C.

- Laver 3 X avec 200µl de RPMI contenant 10% de FCS.

-Eliminer le milieu et ajouter 200µl de RPMI+FCS 10% et gentamycine (50 mg/ml) afin d'éliminer les bactéries extracellulaires.

10.3. Quantification de la DI

La dose infectante est calculé afin de contrôler réellement la quantité de bactéries mis en contact avec les cellules eucaryotes.

-La solution bactérienne utilisée pour l'infection est diluée de 10 en 10 et déposée sur milieu 2YT agar

-Incuber à 37°C pendant 3-4 jours

- Dénombrer les CFU (colony forming unit).

10.4. Dénombrement des bactéries intracellulaires

-Eliminer le milieu de culture.

-Laver 3 fois avec 200 µl de RPMI.

-Au temps post-infection (48h) désiré les cellules eucaryotes sont lysées en ajoutant 100µl de PBS TritonX100 0,1% pendant 30 minutes à 37°C.

-Le Lysat est diluées de 10 en 10 jusqu'à la dilution 10^5 . Les dilutions 10^5 , 10^4 , 10^3 sont étalées sur milieu 2YT.

-Après 3 jours d'incubation à 37°C les CFU sont dénombrés. Ces CFU correspondent aux nombres de bactéries intracellulaire résultant de l'infection.

Solution

-PBS TritonX100 0,1% : pour 500ml

-0,5g d triton

-50ml d PBS10x

-450ml d'eau distillée.

BIBLIOGRAPHIE

Adams, D. G. (1997). Cyanobacteria. In *Bacteria as multicellular organisms*, J. A. Shapiro and M. Dworkin, eds. (New York: Oxford University Press, Inc.), pp. 109-148.

Adler, J. (1983). Bacterial chemotaxis and molecular neurobiology. *Cold. Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.* 48, 803-4.

Allardet-Servent, A., Carles-Nurit, M. J., Bourg, G., Michaux, S., and Ramuz, M. (1991). Physical map of the *Brucella melitensis* 16 M chromosome. *J. bacteriol.* 173, 2219-24.

Allison, C., Lai, H. C., and Hughes, C. (1992). Co-ordinate expression of virulence genes during swarm-cell differentiation and population migration of *Proteus mirabilis*. *Mol. Microbiol.* 6, 1583-91.

Alton, G., Jones, L., Angus, R., and Verger, J.-M. (1988). Techniques for the brucellosis laboratory (INRA, Paris).

Bainton, N. J., Stead, P., Chhabra, S. R., Bycroft, B. W., Salmond, G. P., Stewart, G. S., and Williams, P. (1992). N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone regulates carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora*. *Biochem. J.* 288, 997-1004.

Bassler, B. L. (1999). How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 582-587.

Beck von Bodman, S., and Farrand, S. K. (1995). Capsular polysaccharide biosynthesis and pathogenicity in *Erwinia stewartii* require induction by an N-acylhomoserine lactone autoinducer. *J. bacteriol.* 177, 5000-8.

Belas, R. (1997). *Proteus mirabilis* and other swarming bacteria. In *Bacteria as multicellular organisms*, J. A. Shapiro and M. Dworkin, eds. (New York: Oxford University Press, Inc.), pp. 183-219.

Belas, R., Goldman, M., and Ashliman, K. (1995). Genetic analysis of *Proteus mirabilis* mutants defective in swarmer cell elongation. *J. bacteriol.* 177, 823-8.

Boylan, M., Graham, A. F., and Meighen, E. A. (1985). Functional identification of the fatty acid reductase components encoded in the luminescence operon of *Vibrio fischeri*. *J. bacteriol.* 163, 1186-90.

Boylan, M., Miyamoto, C., Wall, L., Graham, A., and Meighen, E. (1989). Lux C, D and E genes of the *Vibrio fischeri* luminescence operon code for the reductase, transferase, and synthetase enzymes involved in aldehyde biosynthesis. *Photochem Photobiol* 49, 681-8.

Brint, J. M., and Ohman, D. E. (1995). Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhlR-RhlI, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *J. bacteriol.* 177, 7155-63.

Choi, S. H., and Greenberg, E. P. (1991). The C-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein contains an inducer-independent lux gene activating domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 11115-9.

Choi, S. H., and Greenberg, E. P. (1992). Genetic dissection of DNA binding and luminescence gene activation by the *Vibrio fischeri* LuxR protein. *J. bacteriol.* 174, 4064-9.

Darnell, J., Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S. L., and Matsudaira, P. (1995). *Molecular cell biology*, Third Edition (New York: Scientific American Books, Inc.).

Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Igleski, B. H., Costerton, J. W., and Greenberg, E. P. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm [see comments]. *Science* 280, 295-8.

Devine, J. H., Shadel, G. S., and Baldwin, T. O. (1989). Identification of the operator of the lux regulon from the *Vibrio fischeri* strain ATCC7744. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 5688-92.

Dong, Y. H., Xu, J. L., Li, X. Z., and Zhang, L. H. (2000). AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora* [In Process Citation]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3526-31.

Dunlap, P. V. (1997). N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers in bacteria. In *Bacteria as multicellular organisms*, J. A. Shapiro and M. Dworkin, eds. (New York: Oxford University press, Inc.), pp. 69-108.

Dunlap, P. V., and Greenberg, E. P. (1988). Control of *Vibrio fischeri* lux gene transcription by a cyclic AMP receptor protein-luxR protein regulatory circuit. *J. bacteriol.* 170, 4040-6.

Dunny, G. M., and Winans, S. C. (1999). Bacterial life: neither lonely nor boring. In *Cell-Cell Signaling in Bacteria*, G. M. Dunny and S. C. Winans, eds. (Washington, D.C.: ASM), pp. 1-5.

Eberhard, A. (1972). Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis. *J. bacteriol.* 109, 1101-5.

Eberhard, A., Widrig, C. A., McBath, P., and Schineller, J. B. (1986). Analogs of the autoinducer of bioluminescence in *Vibrio fischeri*. *Arch Microbiol* 146, 35-40.

Engbrecht, J., Nealson, K., and Silverman, M. (1983). Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell* 32, 773-81.

Fuqua, C., Burbea, M., and Winans, S. C. (1995). Activity of the *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer regulator TraR is inhibited by the product of the traM gene. *J. bacteriol.* 177, 1367-73.

Fuqua, C., and Eberhard, A. (1999). Signal generation in autoinduction systems: synthesis of acylated homoserine lactones by luxI-type proteins. In *Cell-cell signaling in bacteria*, G. M. Dunny and S. C. Wionans, eds. (Washington, DC.: American Society for Microbiology), pp. 211-230.

Fuqua, C., and Greenberg, E. P. (1998). Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactones. *Curr. Opin. Microbiol.* 1, 183-9.

Fuqua, C., Winans, S. C., and Greenberg, E. P. (1996). Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* 50, 727-51.

Fuqua, W. C., Winans, S. C., and Greenberg, E. P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density- responsive transcriptional regulators. *J. bacteriol.* 176, 269-75.

Gambello, M. J., and Iglewski, B. H. (1991). Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* lasR gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J. bacteriol.* 173, 3000-9.

Gilson, L., Kuo, A., and Dunlap, P. V. (1995). AinS and a new family of autoinducer synthesis proteins. *J. bacteriol.* 177, 6946-51.

- Godfroid, F., Taminiau, B., Danese, I., Denoel, P., Tibor, A., Weynants, V., Cloeckert, A., Godfroid, J., and Letesson, J. J. (1998). Identification of the perosamine synthetase gene of *Brucella melitensis* 16M and involvement of lipopolysaccharide O side chain in *Brucella* survival in mice and in macrophages. *Infect Immun* 66, 5485-93.
- Gray, K. M. (1997). Intercellular communication and group behavior in bacteria. *Trends Microbiol* 5, 184-8.
- Gray, K. M., and Greenberg, E. P. (1992). Physical and functional maps of the luminescence gene cluster in an autoinducer-deficient *Vibrio fischeri* strain isolated from a squid light organ. *J. bacteriol.* 174, 4384-90.
- Hwang, I., Li, P. L., Zhang, L., Piper, K. R., Cook, D. M., Tate, M. E., and Farrand, S. K. (1994). TraI, a LuxI homologue, is responsible for production of conjugation factor, the Ti plasmid N-acylhomoserine lactone autoinducer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4639-43.
- Kahn, D., and Ditta, G. (1991). Modular structure of FixJ: homology of the transcriptional activator domain with the -35 binding domain of sigma factors. *Mol. Microbiol.* 5, 987-97.
- Kaiser, D., and Losick, R. (1993). How and why bacteria talk to each other. *Cell* 73, 873-85.
- Kaplan, H. B., and Greenberg, E. P. (1985). Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J. bacteriol.* 163, 1210-4.
- Kleerebezem, M., Quadri, L. E., Kuipers, O. P., and de Vos, W. M. (1997). Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal- transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 24, 895-904.
- Kolibachuk, D., and Greenberg, E. P. (1993). The *Vibrio fischeri* luminescence gene activator LuxR is a membrane- associated protein. *J. bacteriol.* 175, 7307-12.
- Kuo, A., Blough, N. V., and Dunlap, P. V. (1994). Multiple N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers of luminescence in the marine symbiotic bacterium *Vibrio fischeri*. *J. bacteriol.* 176, 7558-65.
- Kuspa, A., and Kaiser, D. (1989). Genes required for developmental signalling in *Myxococcus xanthus*: three asg loci. *J. bacteriol.* 171, 2762-72.

- Manefield, M., de Nys, R., Kumar, N., Read, R., Givskov, M., Steinberg, P., and Kjelleberg, S. (1999). Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. *Microbiology* 145, 283-91.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- McClean, K. H., Winson, M. K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S. R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J. H., Swift, S., Bycroft, B. W., Stewart, G. S., and Williams, P. (1997). Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology* 143, 3703-11.
- McGowan, S., Sebaihia, M., Jones, S., Yu, B., Bainton, N., Chan, P. F., Bycroft, B., Stewart, G. S., Williams, P., and Salmond, G. P. (1995). Carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora* is regulated by CarR, a homologue of the LuxR transcriptional activator [published erratum appears in *Microbiology* 1995 May;141(Pt 5):1268]. *Microbiology* 141, 541-50.
- McKenney, D., Brown, K. E., and Allison, D. G. (1995). Influence of *Pseudomonas aeruginosa* exoproducts on virulence factor production in *Burkholderia cepacia*: evidence of interspecies communication. *J. bacteriol.* 177, 6989-92.
- McKnight, S. L., Iglewski, B. H., and Pesci, E. C. (2000). The *pseudomonas* quinolone signal regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* [In Process Citation]. *J. bacteriol.* 182, 2702-8.
- Meighen, E. A. (1991). Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiol Rev* 55, 123-42.
- Michaux, S., Paillisson, J., Carles-Nurit, M. J., Bourg, G., Allardet-Servent, A., and Ramuz, M. (1993). Presence of two independent chromosomes in the *Brucella melitensis* 16M genome. *J. bacteriol.* 175, 701-5.
- Miller, J. F., Mekalanos, J. J., and Falkow, S. (1989). Coordinate regulation and sensory transduction in the control of bacterial virulence. *Science* 243, 916-22.
- More, M. I., Finger, L. D., Stryker, J. L., Fuqua, C., Eberhard, A., and Winans, S. C. (1996). Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates [see comments]. *Science* 272, 1655-8.

Moreno, E. (1998). Genome evolution within the *alpha Proteobacteria*: why do some bacteria not possess plasmids and others exhibit more than one different chromosome? FEMS Microbiol Rev 22, 255-75.

Moreno, E., Stackerbrandt, M., Drosch, J., Wolters, M., and Bush and Mayer, H. (1990). *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision.

Nealson, K. H., Eberhard, A., and Hastings, J. W. (1972). Catabolite repression of bacterial bioluminescence: functional implications. Proc Natl Acad Sci U S A 69, 1073-6.

Neidhardt, F., Ingraham, J., and Schaechter, M. (1990). Physiology of the bacterial cell.

O'Callaghan, D., Cazevieille, C., Allardet-Servent, A., Boschioli, M. L., Bourg, G., Foulongne, V., Frutos, P., Kulakov, Y., and Ramuz, M. (1999). A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. Mol. Microbiol. 33, 1210-20.

Pearson, J. P., Van Delden, C., and Iglewski, B. H. (1999). Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. J. bacteriol. 181, 1203-10.

Pesci, E. C., Milbank, J. B., Pearson, J. P., McKnight, S., Kende, A. S., Greenberg, E. P., and Iglewski, B. H. (1999). Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 11229-34.

Pierson III, L. S., Wood, D. W., and Beck von Bodman, S. (1999). Quorum sensing in plant-associated bacteria. In Cell-cell signaling in bacteria, G. M. dunny and S. C. Winans, eds. (Washington, D.C.: American Society for Microbiology), pp. 101-117.

Pierson III, L. S., Wood, D. W., and Pierson, E. A. (1998). Homoserine lactone-mediated gene regulation in plant-associated bacteria. Annu Rev Phytopathol 36, 207-225.

Piper, K. R., Beck von Bodman, S., and Farrand, S. K. (1993). Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction. Nature 362, 448-50.

Pirhonen, M., Flego, D., Heikinheimo, R., and Palva, E. T. (1993). A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *Embo J* 12, 2467-76.

Plamann, L., and Kaplan, H. B. (1999). Cell-density sensing during early development in *Myxococcus xanthus*. In *Cell-cell Signaling in Bacteria*, G. M. Dunny and S. C. winans, eds. (Washington, D.C.: American Society for Microbiology), pp. 67-82.

Prigent-Combaret, C., Vidal, O., Dorel, C., and Lejeune, P. (1999). Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J. bacteriol.* 181, 5993-6002.

Reyrat, J. M., Pelicic, V., Gicquel, B., and Rappuoli, R. (1998). Counterselectable markers: untapped tools for bacterial genetics and pathogenesis. *Infect Immun* 66, 4011-7.

Salmond, G. P., Bycroft, B. W., Stewart, G. S., and Williams, P. (1995). The bacterial 'enigma': cracking the code of cell-cell communication [published erratum appears in *Mol. Microbiol.* 1996 Feb;19(3):649]. *Mol. Microbiol.* 16, 615-24.

Schaefer, A. L., Val, D. L., Hanzelka, B. L., Cronan, J. E., Jr., and Greenberg, E. P. (1996). Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9505-9.

Shadel, G. S., Devine, J. H., and Baldwin, T. O. (1990). Control of the lux regulon of *Vibrio fischeri*. *J Biolumin Chemilumin* 5, 99-106.

Shimkets, L. J., and Kaiser, D. (1999). Cell contact-dependent C signaling in *Myxococcus xanthus*. In *Cell-cell Signaling in Bacteria*, G. M. Dunny and S. C. winans, eds. (Washington, D.C.: American Society for Microbiology), pp. 83-100.

Slock, J., VanRiet, D., Kolibachuk, D., and Greenberg, E. P. (1990). Critical regions of the *Vibrio fischeri* luxR protein defined by mutational analysis. *J. bacteriol.* 172, 3974-9.

Stevens, A. M., Dolan, K. M., and Greenberg, E. P. (1994). Synergistic binding of the *Vibrio fischeri* LuxR transcriptional activator domain and RNA polymerase to the lux promoter region [published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 Apr 11;92(8):3631]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12619-23.

Stevens, A. M., Fujita, N., Ishihama, A., and Greenberg, E. P. (1999). Involvement of the RNA polymerase alpha-subunit C-terminal domain in LuxR-dependent activation of the *Vibrio fischeri* luminescence genes. *J. bacteriol.* 181, 4704-7.

Swartzman, A., Kapoor, S., Graham, A. F., and Meighen, E. A. (1990). A new *Vibrio fischeri* lux gene precedes a bidirectional termination site for the lux operon. *J. bacteriol.* 172, 6797-802.

Swift, S., Winson, M. K., Chan, P. F., Bainton, N. J., Birdsall, M., Reeves, P. J., Rees, C. E., Chhabra, S. R., Hill, P. J., Throup, J. P., and *et al.* (1993). A novel strategy for the isolation of luxI homologues: evidence for the widespread distribution of a LuxR:LuxI superfamily in enteric bacteria. *Mol. Microbiol.* 10, 511-20.

Tang, H. B., DiMango, E., Bryan, R., Gambello, M., Iglewski, B. H., Goldberg, J. B., and Prince, A. (1996). Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection. *Infect Immun* 64, 37-43.

Throup, J. P., Camara, M., Briggs, G. S., Winson, M. K., Chhabra, S. R., Bycroft, B. W., Williams, P., and Stewart, G. S. (1995). Characterisation of the *yenI/yenR* locus from *Yersinia enterocolitica* mediating the synthesis of two N-acylhomoserine lactone signal molecules. *Mol. Microbiol.* 17, 345-56.

Ulitzur, S. (1989). The regulatory control of the bacterial luminescence system--a new view. *J Biolumin Chemilumin* 4, 317-25.

Visick, K. L., and Ruby, E. G. (1999). The emergent properties of quorum sensing: consequences to bacteria of autoinducer signaling in their natural environment. In *Cell-cell signaling in bacteria*, A. S. F. Microbiology, ed. (Washington, D.C.: Dunne, G.M. Winans, S.C.), pp. 333-352.

Watnick, P., and Kolter, R. (2000). Biofilm, city of microbes [In Process Citation]. *J. bacteriol.* 182, 2675-9.

Welch, M., Todd, D. E., Whitehead, N. A., McGowan, S. J., Bycroft, B. W., and Salmond, G. P. (2000). N-acyl homoserine lactone binding to the CarR receptor determines quorum-sensing specificity in *Erwinia*. *Embo J* 19, 631-641.

Winans, S., Zhu, J., and Moré, M. (1999). Cell density-dependent gene expression by *Agrobacterium tumefaciens* during colonization of crown gall tumors. In *Cell-cell signaling in*

bacteria, M. Dunny and S. Winans, eds. (Washington,D.C.: American Society for Microbiology), pp. 117-128.

Wirth, R., Muscholl, A., and Wanner, G. (1996). The role of pheromones in bacterial interactions. *Trends Microbiol* 4, 96-103.